



# UNIVERSITÀ DI PISA

**Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale**

**Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia**

Tesi di Laurea

## **EPATITE AUTOIMMUNE DEL BAMBINO: EVOLUZIONE A LUNGO TERMINE**

Relatore:

*Chiar.mo Prof. Giuseppe Maggiore*

Candidata:

*Lorenza Lepore*

Anno Accademico 2012/2013

## ***Sommario***

<b>RIASSUNTO.....</b>	<b>2</b>
<b>CAPITOLO 1.....</b>	<b>5</b>
1.0. MALATTIE AUTOIMMUNI DEL FEGATO .....	5
1.1 EPATITE AUTOIMMUNE .....	5
1.1.2 <i>Differenti sottotipi di epatiti autoimmuni</i> .....	7
1.1.3 <i>Eziopatogenesi</i> .....	8
1.1.4. <i>Manifestazioni cliniche</i> .....	22
1.1.5. <i>Aspetti biumorali</i> .....	27
1.1.6. <i>Quadro istopatologico</i> .....	32
1.1.7. <i>Diagnosi</i> .....	36
1.1.8. <i>Terapia</i> .....	39
1.2. LONG-TERM OUTCOME.....	46
<b>CAPITOLO 2.....</b>	<b>49</b>
2.0. SCOPO DELLO STUDIO .....	49
2.1. PAZIENTI E METODI .....	50
2.2. ANALISI STATISTICA.....	56
2.3. RISULTATI.....	57
2.4. DISCUSSIONE .....	70
2.5. CONCLUSIONI.....	74
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>75</b>

## *Riassunto*

L'epatite autoimmune è una patologia infiammatoria cronica del fegato, prevalente nel sesso femminile. È una malattia progressiva che, se non adeguatamente trattata, evolve inesorabilmente verso un danno irreversibile del parenchima epatico ed è gravata, per questo, da un'elevata morbilità e mortalità. L'epatite autoimmune è caratterizzata dalla presenza di uno specifico pattern autoanticorpale sulla base del quale si distinguono due sottotipi di malattia: epatite autoimmune di tipo 1 e di tipo 2. Il tipo 1 è caratterizzato dalla presenza di anticorpi anti-nucleo (ANA) e/o anti-muscolo liscio (SMA); può presentarsi a tutte le età, ma mostra due picchi di incidenza, il primo in età puberale ed il secondo dopo i trent'anni. Il tipo 2 è caratterizzato dalla presenza di anticorpi anti-microsoma di fegato e rene di tipo 1 (anti-LKM 1) e/o anti-citosol epatico di tipo 1 (anti-LC 1) ed esordisce prevalentemente in età pediatrica.

La diagnosi si fonda su un insieme di elementi clinici, bioumorali e sul riscontro del tipico quadro istologico di epatite d'interfaccia con massiccia infiltrazione portale di elementi mononucleati e plasmacellule. Il trattamento convenzionale si basa sull'uso di dosi elevate di prednisone associate o meno ad azatioprina; l'unica alternativa concreta alle alte dosi di steroide è rappresentata dalla ciclosporina. Una volta raggiunta la remissione clinica e bioumorale, la terapia è progressivamente ridotta fino al raggiungimento della dose minima necessaria a evitare le recidive. La durata ottimale del trattamento non è conosciuta, tuttavia la terapia immunosoppressiva è protratta per almeno a cinque anni dall'induzione della remissione prima di tentare una sospensione. D'altra parte, il rischio di recidiva è presente in ogni fase della malattia, anche in assenza di fattori scatenanti, pur essendo maggiore in caso di una durata di trattamento inferiore ai 2 anni ed in caso di inadeguata aderenza al trattamento.

La prognosi a lungo termine dell'epatite autoimmune diagnosticata in età pediatrica è ancora poco nota. In letteratura sono ad oggi riportati 4 studi sull'outcome a lungo termine

delle epatiti autoimmuni diagnosticate in età pediatrica: dopo un follow-up variabile dai 4,8 ai 10 anni, la sopravvivenza globale dei pazienti in terapia immunosoppressiva supera l'80%.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di raccogliere e analizzare i dati della sorveglianza a lungo termine dei pazienti con epatite autoimmune afferenti presso l'Unità Operativa di Epatologia e Gastroenterologia Pediatrica di Pisa, con un follow-up minimo di 5 anni, per descriverne e valutarne l'evoluzione. Nei 23 pazienti arruolati la diagnosi di epatite autoimmune è stata effettuata all'età mediana di 7,1 anni (range 1,3-14,8 anni) ed il follow-up mediano è stato di 12,7 anni (range 5,8-24,1 anni), il più lungo follow-up descritto in letteratura. Dopo l'inizio del trattamento tutti i pazienti hanno raggiunto la remissione clinica e bioumorale dopo un periodo mediano di 8 settimane (range 4-35,9 settimane) senza differenze temporali statisticamente significative nell'EAI-1 e EAI-2. Sette pazienti (30%) non hanno mai presentato recidive in corso di terapia immunosoppressiva; sedici pazienti (70%) hanno presentato una o più recidive durante il trattamento. L'analisi dei fattori predittivi di recidiva ha evidenziato il PT come parametro statisticamente significativo, seppure l'analisi di regressione multivariata sul dato non ha raggiunto la significatività statistica. I pazienti affetti, inoltre, da patologie autoimmuni extraepatiche, presentavano un maggior rischio, statisticamente significativo, di presentare una o più recidive rispetto ai pazienti senza patologie autoimmuni associate. Nel 31% dei casi le recidive sono state attribuibili a una scarsa aderenza al trattamento immunosoppressivo. La probabilità di recidiva nei primi 5 anni di terapia è risultata del 45%, indicando la necessità di una terapia prolungata.

Al termine del follow-up, tutti i pazienti sono viventi, l'età mediana è di 22,8 anni, 22 dei 23 pazienti con fegato nativo (96%). La sospensione del trattamento immunosoppressivo è stata possibile in 2 pazienti (8%; 1 EAI-1, 1 EAI-2) rispettivamente fuori terapia da 10 e 74 mesi. Venti pazienti (87%; 9 EAI-1; 11 EAI-2) al termine del periodo di osservazione sono ancora in terapia immunosoppressiva con remissione clinica e bioumorale. Cinque di questi pazienti (22%; 2 EAI-1; 3 EAI-2) presentano un outcome positivo, definito come una remissione clinica e bioumorale persistente da almeno 3 anni in corso di monoterapia.

In un solo caso di EAI-2 (4%), la malattia è progredita determinando un'insufficienza epatocellulare e manifestando le complicanze di un'ipertensione portale tale da rendere necessario un trapianto di fegato all'età di 26,8 anni, dopo 13,7 di terapia.

Effetti avversi severi del trattamento immunosoppressivo sono stati riportati in 4 pazienti (17%), tutti attribuibili all'utilizzo di dosi elevate di steroide per periodi protratti.

La valutazione dell'evoluzione a lungo termine dell'epatite autoimmune di tipo 1 e 2 diagnosticata in età pediatrica ha evidenziato che un adeguato trattamento immunosoppressivo è associato con una sopravvivenza a lungo termine con il fegato nativo nella quasi totalità dei pazienti. L'inizio tempestivo del trattamento, l'identificazione precoce dei pazienti ad esordio più severo, scarsamente responsivi con malattie autoimmuni extraepatiche associate ed il controllo assiduo dell'aderenza alla terapia immunosoppressiva sono fattori essenziali per limitare l'incidenza delle recidive e quindi la progressione della malattia e delle sue complicanze tardive. Il PT all'esordio della malattia rappresenta un fattore prognostico per l'outcome della malattia.

# *Capitolo 1*

## ***1.0. Malattie Autoimmuni del fegato***

In età pediatrica, le malattie autoimmuni del fegato e delle vie biliari comprendono due distinte entità: l'epatite autoimmune e la colangite sclerosante autoimmune. L'elemento caratterizzante è rappresentato dalla flogosi cronica che interessa l'epatocita nell'epatite autoimmune e le strutture biliari nella colangite. Entrambe evolvono spontaneamente, attraverso la necrosi del parenchima epatico, verso la cirrosi.

La colangite sclerosante autoimmune interessa prevalentemente i bambini più grandi e di sesso maschile. In essa le lesioni dei piccoli dotti si associano a quelle dei dotti di calibro maggiore, determinando il caratteristico quadro radiologico "a corona di rosario". Si riconosce, inoltre, una forma di colangite esclusiva dei piccoli dotti. Questa condizione è in stretta associazione con una forma di malattia infiammatoria cronica intestinale con caratteristiche peculiari sia dalla retto colite ulcerosa che dalla malattia di Chron.

Il danno epatocitario ed il danno biliare possono poi coesistere in una forma intermedia di malattia in cui le caratteristiche cliniche e istologiche dell'epatite autoimmune e della colangite rappresentano gli estremi di uno spettro continuo di presentazione. Si configura così la sindrome "overlap".<sup>1</sup>

## ***1.1 Epatite Autoimmune***

L'epatite autoimmune è una patologia infiammatoria cronica del fegato prevalente nel sesso femminile e tipica del bambino. Si caratterizza per alti livelli sierici di transaminasi e immunoglobuline di classe G, presenza di autoanticorpi organo e non-organo specifici e quadro istopatologico di epatite di interfaccia. L'eziologia non è nota e si postula che fattori ambientali inneschino, in individui geneticamente predisposti, una risposta

inappropriata e duratura verso uno o più autoantigeni. La presentazione clinica è eterogenea e la malattia non tende alla guarigione spontanea bensì evolve, in assenza di terapia, verso la cirrosi attraverso ondate di necrosi del parenchima epatico.

La prima descrizione della malattia risale al 1950, quando Jan Waldenström descrisse il caso di un'adolescente con malattia infiammatoria del fegato ad insorgenza acuta e rapidamente evolutiva verso la cirrosi; la malattia venne chiamata "epatite lupoide" per le sue analogie sierologiche (anticorpi antinucleo) con il lupus eritematoso sistemico. Il riconoscimento dell'epatite autoimmune come entità autonoma sarà più tardivo: fino alla fine degli anni Ottanta, infatti, verrà identificata come "epatite cronica attiva HBsAg-negativa", a testimonianza dell'estraneità eziologica dell'unica causa allora conosciuta di epatite cronica, l'epatite B, per essere infine ribattezzata "epatite autoimmune" sulla base dei caratteristici elementi sierologici e della risposta al trattamento con corticosteroidi.

Il profilo anticorpale permette di riconoscere due distinti tipi di epatite autoimmune :

- **epatite autoimmune di tipo 1**, caratterizzata dalla presenza di autoanticorpi anti-muscolo liscio (SMA) e/o di anticorpi antinucleo (ANA)<sup>2,3</sup>;
- **epatite autoimmune di tipo 2**, caratterizzata dalla presenza di anticorpi anti microsoma di fegato e rene di tipo 1 (anti LKM-1) e/o anticorpi anti citosol epatico tipo 1 (anti LC-1)<sup>2,4</sup>.

### ***1.1.1. Epidemiologia***

L'epatite autoimmune è una patologia rara con un'ampia variabilità di prevalenza nelle diverse razze e regioni geografiche. I più cospicui dati a disposizione riguardano l'adulto. Uno studio epidemiologico norvegese<sup>5</sup> evidenzia un'incidenza di epatite autoimmune di tipo 1 tra gli individui di razza bianca nel Nord Europa e Nord America tra lo 0,1 e 1,9 casi/100,000 abitanti/anno e una minore incidenza in Giappone, stimata da 0,08 a 0,15 casi /100,000 abitanti/anno<sup>6</sup>.

L'epatite autoimmune di tipo 2 risulta, invece, più diagnosticata nella popolazione bianca del sud dell'Europa piuttosto che nel Nord Europa ed America. Ad ogni modo, il carattere insidioso della patologia ne suggerisce una prevalenza maggiore.

Per quanto riguarda la popolazione pediatrica, i dati inerenti la prevalenza non sono ben definiti; si stima che in un centro pediatrico di riferimento vengano generalmente effettuate 4-5 diagnosi di epatite autoimmune per anno. Un recente studio ha calcolato la prevalenza e l'incidenza delle malattie infiammatorie epatiche e croniche intestinali nella popolazione pediatrica dello stato di Utah (Stati Uniti). Relativamente alle epatiti autoimmuni vengono riportate una prevalenza ed un'incidenza di 0,4/100000 e 3 casi/100000 bambini/anno, rispettivamente<sup>7</sup>.

Entrambi i sessi possono esserne affetti, anche se si evidenzia una predilezione 3,6 volte maggiore per il sesso femminile; la malattia può esordire a qualsiasi età, ma più della metà dei casi vengono diagnosticati durante l'infanzia e l'adolescenza<sup>8</sup>.

La malattia pediatrica paragonata a quella dell'adulto mostra importanti differenze: nell'infanzia e nell'adolescenza l'epatite autoimmune si presenta clinicamente in modo indistinguibile da una epatite acuta virale, con ittero, epatomegalia e talora segni di insufficienza epatica; nell'adulto l'esordio può essere subdolo, paucisintomatico, con attività citolitica moderata e scarsa fibrosi alla biopsia, elementi che possono indurre il clinico ad astenersi dal trattamento.

### ***1.1.2 Differenti sottotipi di epatiti autoimmuni***

Al profilo auto-anticorpale tipico di ciascuna delle due forme di epatite autoimmune si accompagnano altri caratteri distintivi.

L'epatite autoimmune di tipo 1 rappresenta i due terzi di tutte le epatiti autoimmuni. Nel 75% dei casi esordisce in età puberale<sup>2</sup>, mentre un secondo picco d'incidenza si rileva dopo i trent'anni. L'epatite autoimmune di tipo 2 insorge, invece, più precocemente, anche nel corso del primo anno di vita, motivo per cui viene considerata una condizione prevalentemente pediatrica.

Il tipo 1 si presenta tipicamente con un importante aumento dei titoli di IgG e con sintomatologia così scarsa tale da poter condurre silenziosamente ad una severa compromissione della funzione epatica; possono inoltre associarsi manifestazioni cliniche



extraepatiche di natura autoimmune o comunque immunomediate come vasculiti, artriti, emopatie, endocrinopatie.

Il tipo 2 è più spesso caratterizzato da un esordio fulminante con valori di transaminasi e bilirubina elevati e da una progressione di malattia per “ondate” di necrosi, con periodi prolungati di remissione spontanea. L’ipergammaglobulinemia è moderata e occasionalmente assente ed è più frequente un deficit di IgA<sup>2</sup>. Anche l’epatite autoimmune di tipo 2 è frequentemente associata a malattie autoimmuni, in particolare sono frequenti le tiroiditi ed è, inoltre, tipica l’associazione con una forma genetica di poliendocrinopatia autoimmune i cui caratteri principali sono la candidiasi muco-cutanea cronica, l’ipoparatiroidismo e l’insufficienza surrenalica autoimmune dei surreni.

Diversamente dall’epatite di tipo 1 in cui può coesistere un interessamento epatico e biliare, l’epatite autoimmune di tipo 2 ha come bersaglio esclusivo l’epatocita e viene perciò considerata la vera epatite autoimmune.

### ***1.1.3 Eziopatogenesi***

#### ***Genetica***

Diversi geni conferiscono suscettibilità all’epatite autoimmune, ne influenzano le manifestazioni cliniche, la risposta al trattamento e soprattutto la prognosi. Sebbene il modello di ereditarietà sia sconosciuto, si ritiene che alcuni fattori ambientali possano innescare una reazione autoimmune in soggetti geneticamente predisposti.

La suscettibilità è determinata sia dai geni che codificano per gli antigeni del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), Human leukocyte antigen (HLA) nell’uomo, sia da geni che codificano per diverse altre proteine<sup>9</sup>.

Negli ultimi anni è stato possibile approfondire le conoscenze sui meccanismi molecolari alla base di questa particolare suscettibilità genetica.

Il gruppo di geni polimorfici codificanti per l’MHC è situato sul cromosoma 6. Le molecole dell’MHC svolgono un ruolo chiave nella presentazione degli antigeni ai linfociti T e nell’induzione della risposta immunitaria. Alcuni alleli dell’MHC di classe II risultano

predisponenti alla malattia, tra questi l'HLA-DRB1<sup>10</sup>, che trascrive per la catena DRβ. Il posizionamento del peptide antigenico all'interno del complesso MHC di classe II è influenzato principalmente dalla catena DRβ, catena estremamente polimorfa e che presenta al suo interno tre regioni ipervariabili (HVR). Tra queste l'HVR 3 sembra giocare un ruolo cruciale nella presentazione degli antigeni nell'epatite autoimmune.

In Europa e in Nord America la suscettibilità all'epatite autoimmune di tipo 1 è conferita dall'ereditarietà degli alleli DR3 (DRB1\*0301) e DR4 (DRB1\*0401). Il confronto tra questi due alleli ha dimostrato come entrambi possiedano, nell'ambito della regione HVR3, la medesima sequenza (Leu-Leu-Glu-Gln-Lys-Arg) in posizione DRβ 67-72. Si ritiene che l'amminoacido in posizione 71 svolga un ruolo critico nel legare specifici antigeni alla catena DRβ. In Giappone, Argentina e Messico gli alleli che conferiscono suscettibilità (DRB1\*0405 e DRB1\*0404) presentano una la sequenza amminoacidica DRβ 67-72 molto simile alla precedente, dalla quale si differenziano solo per la sostituzione in posizione 71 della lisina con una arginina, amminoacido ugualmente polare che non altera le proprietà di legame della catena DRβ. Al contrario, la presenza di un amminoacido non-polare come l'alanina in posizione 71 nell'allele DRB1\*1501 conferisce una certa protezione dalle malattie autoimmuni negli europei. Oltre a questo primo modello di suscettibilità ne sono stati descritti altri due. Di questi, uno basato sul dimorfismo valina/leucina in posizione 86 della catena DRβ, che spiegherebbe meglio la suscettibilità nei soggetti brasiliani ed argentini ed un altro che attribuisce importanza alla presenza di istidina in posizione 13 negli alleli DRB1, in quanto particolarmente frequente nei pazienti giapponesi affetti da epatite autoimmune di tipo 1<sup>10, 11</sup>.

I singoli aplotipi sembrerebbero essere associati con alcune caratteristiche cliniche della malattia. L'allele HLA DRB1\*04 si riscontra prevalentemente nelle donne, aumenta il rischio di sviluppare altre malattie autoimmuni, ma predice una buona risposta alla terapia<sup>12</sup>. I pazienti HLA DRB1\*03 esordiscono precocemente con una malattia aggressiva, resistente alla terapia ed evolutiva, come testimonia il più frequente ricorso al trapianto di fegato per i pazienti portatori di questo aplotipo. Infine, nei bambini HLA DRB1\*1301 si evidenzia una maggiore tendenza a sviluppare cirrosi<sup>13</sup>.

La suscettibilità all'epatite autoimmune di tipo 2 viene conferita dall'HLA DRB1\*0301 e DRB1\*0701; anche a quest'ultimo aplotipo si correlano una maggiore severità della malattia e un peggior outcome<sup>14</sup>.

Nei bambini con epatite autoimmune di tipo 2, si evidenzia, inoltre, l'associazione tra bassi livelli sierici di C4 ed alcune delezioni del gene C4A. Queste delezioni danno origine ad un allele silente (C4AQ0) che, se presente in omozigosi, può favorire un decorso più aggressivo della malattia ed un'età di insorgenza più precoce. Per altro, l'allele C4AQ0 è in forte *linkage disequilibrium* con l'HLA A1B8 DR3, per cui non è chiaro se la forte associazione statistica tra i bassi livelli sierici di C4 e l'epatite autoimmune sia dovuta in primo luogo al *linkage disequilibrium* con l'altro gene o a un ruolo primario dell'allele C4AQ0 nell'induzione della malattia<sup>15</sup>.

Altri geni, che non appartengono al locus MHC, sembrano giocare un ruolo nella suscettibilità alle malattie autoimmuni del fegato. Tra i geni maggiormente studiati quelli che codificano per il CD28 ed il CTLA-4 hanno suscitato maggior interesse. Queste proteine sono espresse in maniera esclusiva dal linfocita T e legano i CD80 e CD86 (B7-1 e B7-2) mostrati dalla cellula APC professionale, inducendo il cosiddetto secondo segnale. Il CD28 ha funzione di co-stimolazione nell'attivazione del linfocita T; il CTLA-4 interviene nel fenomeno dell'anergia, qualora il linfocita T abbia riconosciuto un antigene self. L'equilibrio tra questi due segnali, l'uno attivatorio, l'altro inibitorio, svolge un ruolo significativo nel controllo periferico della risposta immune; di conseguenza l'alterazione di CTL4 o di CD28 può favorire l'insorgenza della malattia. Tra i pazienti di razza caucasica affetti da epatite autoimmune di tipo 1 è frequente il riscontro di una sostituzione puntiforme (adenina/guanina) in posizione 49 del gene che codifica per CTLA-4, a cui consegue la trasduzione di una alanina piuttosto che di una treonina<sup>16</sup>. Lo stesso polimorfismo è presente anche in pazienti adulti con cirrosi biliare primitiva e sembrerebbe essere un importante fattore di predisposizione all'epatopatia. Inoltre nel bambino con epatite autoimmune di tipo 1 esiste un aumento significativo della frequenza di trasmissione, da parte dei genitori eterozigoti, di alcuni polimorfismi di CTLA-4, differentemente a quanto rilevato nei bambini con epatite autoimmune di tipo 2<sup>17</sup>. Un recente studio ha evidenziato in gruppi di pazienti con epatite autoimmune un ridotto numero di linfociti T natural killer ed una conseguente minor produzione di interleuchine 2 e 4. Questi bassi livelli di interleuchine ridurrebbero l'espressione di CTLA-4, favorendo i meccanismi di autoimmunità. Recenti indagini evidenziano effettivamente che nei pazienti con epatite autoimmune i linfociti del sangue periferico presentano una minore espressione di CTLA4, mentre prevalgono le molecole di costimolazione (CD80- CD86) sulle cellule

degli infiltrati epatici<sup>18, 19</sup>. Questi dati confermano l'ipotesi che la compromissione dei meccanismi di tolleranza immunitaria rappresenti il motivo di fondo delle patologie autoimmuni.

Un altro importante polimorfismo riguarda il gene che codifica per il fattore di necrosi tumorale  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). Nei pazienti europei affetti da epatite autoimmune di tipo 1 si evidenzia una prevalenza dell'allele TNF $\alpha$ \*2, caratterizzato da una sostituzione di una adenina/guanina in posizione 308. Questo allele condiziona livelli più elevati, sia basali che inducibili, di TNF $\alpha$  e potrebbe giustificare l'elevata incidenza della malattia nelle popolazioni europee e/o la severità della stessa. Il TNF $\alpha$ , d'altra parte, non solo amplifica il processo infiammatorio, ma favorisce la differenziazione dei linfociti T<sub>H</sub>1, cellule che svolgerebbero un ruolo determinante nel danno epatico. In studi genetici l'allele TNF $\alpha$ \*2 risulta in *linkage disequilibrium* con l'HLA A1B8 DR3 ed inoltre, ad una analisi stratificata, lo stesso TNF $\alpha$ \*2 è frequentemente associato all' l'HLA DRB103\*01<sup>20</sup>, dimostrando l'esistenza di più siti di suscettibilità sul cromosoma 6. Il TNF $\alpha$  agisce anche come citochina anti-apoptotica nei confronti dei linfociti attivati; l'apoptosi è essenziale per il mantenimento della tolleranza verso il "self", tramite l'eliminazione di cloni autoreattivi. La modulazione dell'apoptosi indotta dal TNF $\alpha$  avviene mediante il legame con il suo recettore TNF-R1a a cui segue l'attivazione di due vie di trasduzione del segnale: la prima stimola l'apoptosi, la seconda attiva il fattore NFkB che induce la sintesi di una proteina di sopravvivenza, prevenendo la morte cellulare<sup>21</sup>.

Il ruolo esercitato dai meccanismi pro-apoptotici nella patogenesi della malattie autoimmuni è stato ulteriormente approfondito. Alcuni studi hanno indagato la presenza di polimorfismi nel gene *Fas* nei soggetti con epatiti autoimmuni. Questo gene codifica per la proteina di membrana Fas (CD 95) che attraverso il legame al suo recettore FasL (CD 95L) attiva la morte cellulare programmata ed indirettamente controlla il numero di linfociti attivati. La presenza di alcuni specifici alleli del gene *Fas*, rivelata su gruppi di pazienti con epatite autoimmune, ha suggerito l'ipotesi di un possibile influenza nella patogenesi<sup>22</sup>.

Infine, nei pazienti con epatite autoimmune si riscontra una massiccia espressione di marker pro-apoptotici da parte delle cellule linfocitarie e una importante conversione di linfociti T naive in cellule T della memoria. Probabilmente le cellule pro-apoptotiche cercano di contrastare la persistente stimolazione del sistema immunitario che accompagna

la malattia<sup>23</sup>. Sono necessari maggiori studi per valutare le relazioni tra *Fas* e le epatiti autoimmuni.

Le epatiti autoimmuni possono talvolta accompagnare alcuni rari disordini del sistema immunitario. Il 20% dei pazienti affetto da *poliendocrinopatia-autoimmune di tipo 1 (APECED)* presenta un'epatite autoimmune frequentemente di tipo 2<sup>24</sup>. La sindrome APECED è una malattia genetica che insorge nell'infanzia o nella prima adolescenza in combinazione con una candidiasi muco-cutanea cronica, l'ipoparatiroidismo e l'insufficienza autoimmune dei surreni. Si tratta di un disordine autosomico recessivo dovuto alla mutazione del gene AIRE1. Il gene AIRE (AutoImmune Regulator) codifica per il fattore di trascrizione omonimo che è responsabile dell'espressione di molti antigeni proteici self nel timo, nei linfonodi e nella vescica. Questi autoantigeni svolgono un ruolo chiave nel meccanismo di tolleranza centrale. Il riconoscimento da parte di un linfocita T immaturo di un antigene self ne induce l'apoptosi, contribuendo così alla selezione negativa dei linfociti T autoreattivi e prevenendo fenomeni autoimmunitari.

Sebbene si tratti di un disordine recessivo, deve essere meglio stabilita la relazione tra lo stato di eterozigosi e il rischio di epatite autoimmune: mutazioni di AIRE1 sono state riscontrate in tre bambini con una severa epatite autoimmune di tipo 2 seguita da manifestazioni extraepatiche autoimmuni<sup>25</sup>

Infine, un altro fattore ad azione immunomodulatoria indagato è rappresentato dalla vitamina D. L'interazione tra 1,25- diidrossi-D3 ed il suo recettore espresso dai linfociti stimola, indirettamente, l'attivazione dei monociti e macrofagi, previene la trasformazione delle cellule dendritiche in cellule presentanti l'antigene (APC) ed aumenta la produzione delle citochine azione anti-infiammatoria (IL-4 e TGF- $\beta$ ). E' stata suggerita l'associazione tra un particolare polimorfismo del recettore (Fok) e l'insorgenza di epatite autoimmune in pazienti adulti<sup>26</sup>.

In conclusione, tutti questi elementi, variamente combinati, potrebbero rappresentare il substrato genetico dell'epatite autoimmune e di altri disordini immunitari su cui fattori esterni svolgerebbero un ruolo di innesco.

## ***Fattori scatenanti***

Nel corso degli anni, numerosi agenti sono stati valutati come possibili fattori scatenanti la patogenesi dell'epatite autoimmune. Gli studi si sono focalizzati sul ruolo svolto dall'uso di alcuni farmaci e soprattutto su quello esercitato dalle infezioni virali.

Nell'adulto, ma non nel bambino, si evidenzia l'associazione tra l'epatite autoimmune e l'assunzione di antibiotici come l'aminociclina e la nitrofurantoina; secondo uno studio queste due molecole sono responsabili di circa il 90% delle epatiti autoimmuni indotte da farmaci<sup>27</sup>. Sono stati segnalati, inoltre, casi di epatite autoimmune associati a terapie con statine e anti-TNF. Il meccanismo patogenetico è ancora incerto; si suppone che durante i processi di metabolizzazione del farmaco vengano attivati specifici enzimi, che, in ultima istanza, agirebbero come autoantigeni stimolando la risposta immune e la produzione di autoanticorpi.

Da molti anni è noto che le manifestazioni cliniche dell'autoimmunità sono spesso precedute da prodromi infettivi. Diverse sono le modalità attraverso cui le infezioni possono contribuire allo sviluppo dell'autoimmunità.

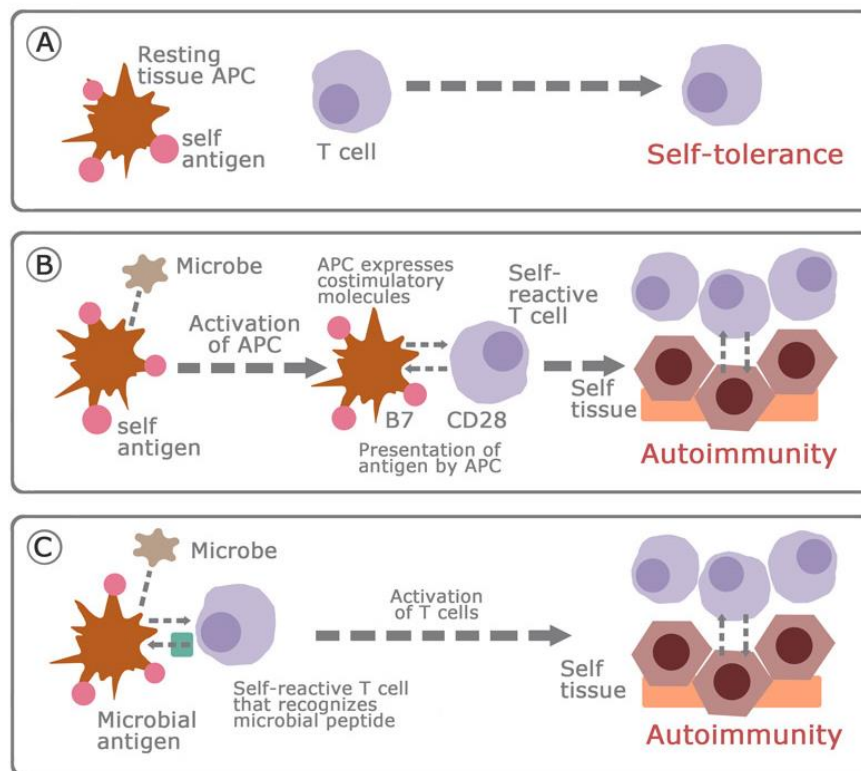
L'infezione a carico di un tessuto può stimolare, localmente, l'attivazione della risposta innata con produzione di citochine e molecole co-stimolatorie da parte delle APC professionali. Le APC, riconoscendo antigeni *self* di quel tessuto, selezionerebbero linfociti T autoreattivi. L'infezione potrebbe così "interrompere" l'anergia del linfocita T autoreattivo, promuovendo la sopravvivenza e l'attivazione. Un secondo meccanismo, maggiormente accreditato, è quello del "mimetismo molecolare". Alcuni agenti infettivi possono produrre antigeni peptidici dotati di similitudini strutturali con antigeni autologhi, capaci quindi di "cross-reagire" tra di loro. Su queste basi, le risposte immuni originariamente dirette contro un peptide microbico potrebbero esprimersi in un attacco diretto verso gli antigeni autologhi. Il 5% dei pazienti affetti da HCV presenta autoanticorpi anti LKM-1, comuni all'epatite autoimmune di tipo 2. Questi autoanticorpi riconoscono l'antigene autologo CYP2D6; si dimostra un'omologia tra alcune delle sequenze amminoacidiche da esso espresse ed alcune proteine, trascritte a partire dal genoma del virus HCV<sup>28</sup>. Corrispondenze vengono riscontrate anche per proteine dei virus

erpetici HSV1 e CMV. Su questi elementi si struttura un importante supporto alla teoria del mimetismo molecolare, tuttavia uno specifico trigger non è stato ancora identificato.

È stato, inoltre, indagato il possibile ruolo del virus del morbillo, dell'EBV, dell'HAV, dell'HBV, dell'HDV e dell'HGV nell'induzione danno, tuttavia uno specifico trigger non è stato ancora identificato.

Infine, è possibile che un danno epatocellulare venga a determinare una massiccia liberazione di antigeni normalmente sequestrati in compartimenti inaccessibili al sistema immunitario, determinando così lo sviluppo di una epatite autoimmune.

**Figura 1:** Tolleranza ed autoimmunità.



Tratto da: Abul K. Abbas et. Al. Le basi dell'immunologia, Elsevier- Masson 2006

## ***Autoantigeni***

Indipendentemente dalla natura del fattore scatenante, la risposta immune si instaura contro uno o più antigeni autologhi. I più accreditati sono rappresentati dal recettore delle asialoglicoproteine (ASGP-R) nell'epatite autoimmune di tipo 1 e il citocromo P450 isoforma 2D6, nell'epatite di tipo 2.

L'ASG-R è un fosfolipide espresso esclusivamente sulla membrana degli epatociti, a livello del versante sinusoidale della cellula; lega le asialoglicoproteine, glicoproteine endogene in cui il residuo terminale di acido sialico viene rimosso dall'enzima sialidasi, mostrando così il galattosio, sito di riconoscimento per ASGP-R<sup>29</sup>. L'ASG-R è un recettore multifunzionale. Inizialmente si riteneva essere coinvolto nella rimozione delle glicoproteine recanti galattosio in posizione terminale; studi successivi ne hanno rivelato il ruolo nella clearance delle cellule apoptotiche e di alcune sottoclassi di IgA; è stato inoltre considerato come possibile recettore per le LDL e chilomicroni remnants e sito di legame per virus epatotropi. Più recenti indagini hanno proposto l'ASG-R come trappola per i linfociti attivati che prenderebbe parte ai processi di immunoregolazione. Il ruolo di ASGP-R nella patogenesi dell'epatite autoimmune tipo 1 è supportato da più evidenze. I primi studi hanno dimostrato la capacità da parte di anticorpi monoclonali specifici per ASGP-R di causare danno epatocitario immunomediato<sup>30</sup>. Successivamente, a partire da prelievi di sangue periferico in pazienti con epatite autoimmune di tipo 1, è stato possibile isolare cloni di linfocita T specifici per ASGP-R: questi cloni hanno dimostrato, in vitro, di poter proliferare in presenza di ASGP-R e stimolare, inoltre, i linfociti B nella produzione di autoanticorpi anti-ASGP-R<sup>31</sup>. Si comprende così l'importanza che assume ASGP-R nell'induzione del danno immunomediato verso gli epatociti, soprattutto in assenza di un efficiente meccanismo di controllo.

Il citocromo P450 2D6 rappresenta il probabile autoantigene dell'epatite autoimmune di tipo 2. Questo enzima catalizza reazioni di ossidazione ed entra in gioco nel metabolismo delle sostanze xenobiotiche che, rese maggiormente idrosolubili, possono più facilmente essere eliminate. È stato dimostrato che questa specifica isoforma dell'enzima è situata



superficie esterna della membrana epatocitaria, oltre che a livello citoplasmatico; ciò suggerisce che, in condizioni fisiologiche, vi sia uno stato di tolleranza immunologica tale da prevenire la maturazione o la stimolazione di linfociti autoreattivi contro questa proteina<sup>32</sup>. Nell'epatite autoimmune di tipo 2 si assiste, invece, ad una risposta autoimmunitaria mediata da linfociti T e B contro il citocromo P450 2D6.

In definitiva, una compromessa regolazione dei meccanismi di tolleranza immunologica rappresenterebbe il substrato per l'insorgenza dell'epatite autoimmune.

### ***Difetto della regolazione della risposta immune***

In condizioni fisiologiche, una delle più importanti caratteristiche del sistema immunitario è rappresentata dalla sua capacità di reagire ad un'enorme varietà di antigeni microbici, discriminandoli dagli antigeni autologhi (self) di un individuo. Questa mancanza di risposta verso gli antigeni self è definita tolleranza immunologica. La capacità del sistema immunitario di distinguere tra self e non self si basa su processi complessi. I meccanismi di tolleranza sono attivi sia a livello centrale che periferico. La tolleranza centrale interessa gli organi linfoidei primari ("centrali") in cui avviene il riconoscimento da parte di linfociti autoreattivi immaturi di antigeni autologhi; in questo processo interviene, come precedentemente delucidato, l'espressione del gene *autoimmune regulator-1 (AIRE-1)* che garantisce la sintesi degli autoantigeni. L'eventuale riconoscimento di un antigene self da parte di un linfocita T autoreattivo, porta alla sua morte per apoptosi. Un ampio numero di linfociti autoreattivi può, tuttavia, sfuggire a questa selezione negativa e dirigersi verso gli organi linfoidei periferici, rappresentando un potenziale pericolo per lo sviluppo di danni autoimmuni. I meccanismi di tolleranza periferica prevengono questo rischio.

Un importante ruolo nei meccanismi di tolleranza periferica è svolto dai linfociti con funzione regolatoria. Sono state descritte diverse sottopopolazioni di linfociti T ad attività regolatoria ed, in particolare, un ruolo cruciale sembrerebbe essere svolto dai cosiddetti *Treg*. Queste cellule rappresentano il 5-10% dei linfociti T CD4+, controllano la risposta immune innata ed adattativa e prevengono l'attivazione e la proliferazione dei cloni T autoreattivi. Sono caratterizzati dall'espressione del CD4, della catena  $\alpha$  del recettore dell'IL-2 (CD25) ed dalla sintesi del fattore di trascrizione FOXP3 (forkhead box-P3). Diversi

studi hanno indagato il ruolo svolto dai Treg nelle patologie autoimmuni, comprese le epatiti autoimmuni.

Già agli inizi degli anni Ottanta era stata riconosciuta una ridotta attività dei linfociti T regolatori nelle epatiti autoimmuni<sup>33</sup>, poi confermata sia in gruppi di adulti che di bambini affetti. Più di recente, uno studio caso-controllo ha dimostrato che i pazienti con epatite autoimmune presentano, alla diagnosi, un numero significativamente ridotto di Treg circolanti, numero che aumenta durante la fase di remissione farmaco-indotta. La percentuale di Treg circolanti risulta, inoltre, essere inversamente proporzionale al titolo autoanticorpale contestualmente misurato; infine, la capacità proliferativa di queste cellule appare ridotta, mentre le funzioni di immuno-regolazione risultano conservate<sup>18, 34</sup>. Il meccanismo d'azione dei Treg, sebbene non sia ancora ben conosciuto, sembra essere sovrapponibile sia nei pazienti che nei controlli. Il contatto diretto tra i linfociti autoreattivi ed i Treg è ritenuto alla base dell'attività di questi ultimi. Esso induce, da un lato, i linfociti T CD4<sup>+</sup> ad una ridotta sintesi di IFN- $\gamma$ , citochina ad attività pro-infiammatoria, dall'altro ad un aumento dei livelli di IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ , con funzioni di immuno-regolazione. In aggiunta, nei Treg si dimostra un importante aumento della sintesi del fattore di trascrizione FOXP3, strettamente correlato con le funzioni di immuno-regolazione<sup>35</sup>.

La compromissione dei Treg e del controllo che esercitano sull'immunità sembrerebbe essere centrale nella patogenesi dell'epatite autoimmune, ma nuove ipotesi vengono continuamente sollevate.

È stata, ultimamente, spostata l'attenzione sulle caratteristiche dei linfociti T CD4<sup>+</sup> isolati dai pazienti con epatite autoimmune. Questi linfociti mostrano, rispetto ai controlli, una ridotta espressione del recettore ad attività inibitoria Tim-3 ( T-cell-immunoglobulin-and-mucin-domain-containing-molecule-3), che attraverso il legame con galectin-9, presente sui Treg, porta i linfociti T all'apoptosi. In questo caso sarebbero i linfociti T CD4<sup>+</sup> a essere poco sensibili all'immuno-regolazione condotta dai Treg<sup>36</sup>.

### ***Meccanismi di danno epatico***

I meccanismi patogenetici che conducono al danno epatico coinvolgono sia l'immunità innata che quella adattativa.

La risposta autoimmune ha inizio con il riconoscimento da parte di un linfocita T di un antigene self presentato dalle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità. Le reazioni autoimmuni che coinvolgono il parenchima epatico prevedono la presentazione dell'autoantigene in situ: le cellule APC professionali, dopo aver processato una proteina autologa, legano i peptidi che ne derivano alle molecole dell'MHC di classe II; questo legame è indispensabile alla successiva presentazione dell'antigene ai linfociti T naïve che, esposti a segnali co-stimolatori, vengono attivati. Le diverse citochine presenti nel microambiente e le caratteristiche dell'antigene inducono la successiva differenziazione in linfociti Th1, Th2 o Th17. Questi sono attori del danno immunomediato. In presenza di IL-2 o IL-4 i linfociti T naïve si differenziano, rispettivamente, in Th1 o Th2, mentre alti livelli di IL-1 $\beta$  e IL-6 stimolano la crescita di Th17.

- I linfociti Th1 rilasciano prevalentemente IL-2 ed INF- $\gamma$ . L'INF- $\gamma$  è considerato il mediatore principale del danno tissutale in quanto attiva i linfociti T CD8<sup>+</sup>, favorisce l'up-regulation delle molecole dell'MHC di classe I e induce una espressione aberrante di MHC di classe II sulla membrana epatocitaria<sup>37</sup>. Quest'ultima azione promuove l'attivazione dei linfociti T e perpetua il danno epatico. L'INF- $\gamma$  agisce, inoltre, nella maturazione dei monociti in macrofagi, delle cellule dendritiche e contribuisce al potenziamento delle funzioni di killing dei NK.
- I linfociti Th2 intervengono attraverso la produzione di IL-4, IL-10 e IL-13 nella differenziazione dei linfociti B in plasmacellule, con conseguente sintesi di autoanticorpi.
- I linfociti Th17 si sviluppano in presenza di TGF- $\beta$  ed IL-6 e prendono parte al danno epatocitario mediante la produzione delle citochine pro-infiammatorie IL-17, IL-22 e TNF- $\alpha$ . In più stimolano gli epatociti al rilascio di IL-6 che, a sua volta, induce l'attivazione dei linfociti Th17<sup>38</sup>. Sebbene il ruolo di questi linfociti nella patogenesi dell'epatite autoimmune sia ancora poco chiaro, recenti studi hanno evidenziato un aumento del loro numero nei pazienti, rispetto ai controlli.

I vari sottotipi linfocitari e le citochine rilasciate stimolano, così, l'attivazione dei meccanismi effettori dell'immunità umorale e cellulo-mediata.

Il contributo dell'immunità umorale alla patogenesi del danno viene dimostrato dal riscontro di elevati titoli di auto-anticorpi rivolti verso antigeni epatici. Si rileva la presenza di auto-anticorpi anti ASGPR, anti ADH (alcol deidrogenasi) e anti SLA (antigene epatico

solubile) ed i loro titoli appaiono correlati con la severità istologica delle lesioni<sup>39, 40</sup>. Inoltre, viene evidenziata la capacità degli anticorpi suddetti di fissarsi alla membrana epatocitaria veicolando il legame al recettore Fc dei mononucleati e partecipando alla *citotossicità anticorpo dipendente cellulo-mediata (ADCC)*<sup>40, 41</sup>. Frammenti bioptici prelevati da pazienti con epatite autoimmune mostrano, infine, epatociti completamente rivestiti di anticorpi, avvalorando il ruolo esercitato dall'immunità umorale. Nelle epatiti autoimmuni di tipo 2, in più, gli autoanticorpi tipici anti-LKM-1 sono diretti verso l'antigene CYP2D6, espresso sul versante esterno dell'epatocita; ciò conferma ulteriormente il ruolo dell'immunità umorale nella patogenesi del danno.

Il coinvolgimento dell'immunità cellulo-mediata è suggerito da più riscontri. Oltre al già citato danno da *citotossicità anticorpo dipendente cellulo-mediata (ADCC)*, si rileva la presenza di linfociti T autoreattivi verso antigeni epatici capaci di indurre la morte epatocitaria<sup>36</sup>. Nei pazienti con epatite autoimmune si misura un numero dieci volte maggiore, rispetto ai controlli, di cellule T autoreattive contro antigeni epatici<sup>14</sup>, sia CD4+ che CD8+. L'azione dei linfociti T CD4+ autoreattivi è stata indagata soprattutto nell'epatite autoimmune di tipo 2, essendo noto l'autoantigene principale. Si dimostra che questi linfociti sono in grado di indurre, una volta a contatto con l'epatocita, una risposta policlonale. Viene, infatti, rilasciato un pattern di citochine tale da garantire da un lato, la stimolazione dei linfociti B e la sintesi di auto-anticorpi, dall'altro ad un danno diretto verso gli epatociti, giustificando il ricco infiltrato epatico di CD4+<sup>42</sup>. Si riscontrano, in aggiunta, linfociti T CD8+ specifici per gli antigeni ASGPR e CYP2D6; questi, dopo aver identificato lo specifico epitopo sulle molecole dell'MHC di classe I, rilasciano INF- $\gamma$  ed inducono la morte cellulare. In questo caso, come nel precedente, linfociti T CD8+ sono ampiamente rappresentati a livello periportale, dato che suggerisce un ruolo nel danno<sup>43</sup>.

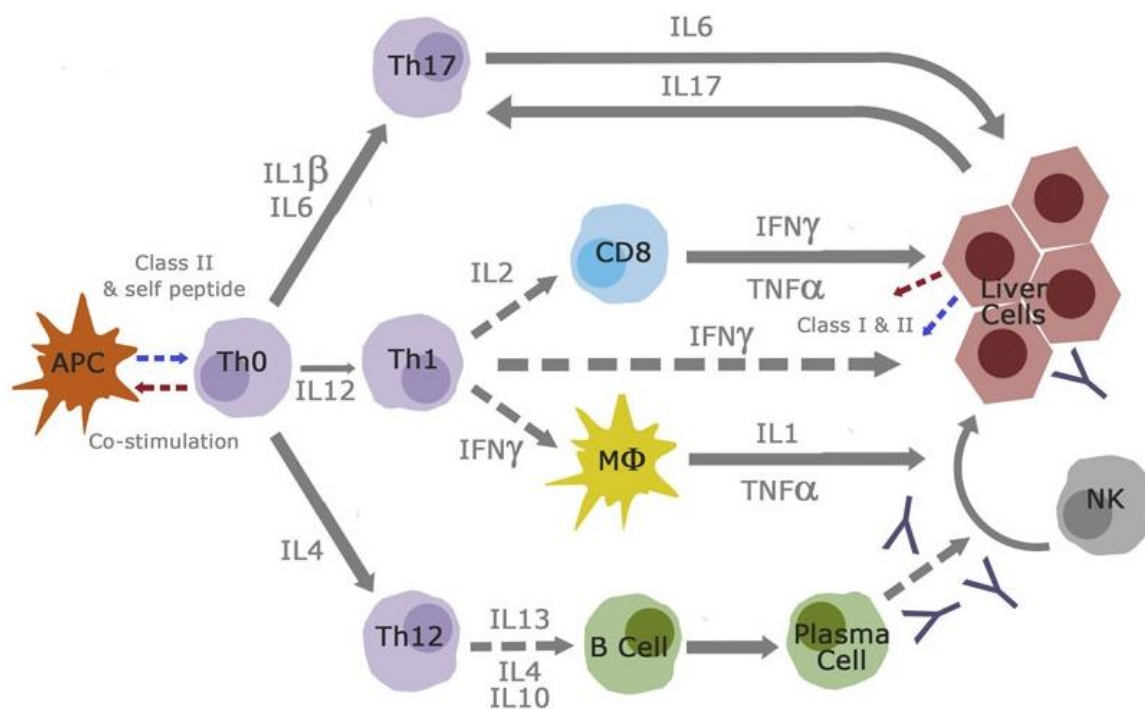
Più recentemente è stato rinnovato l'interesse nei confronti dei linfociti T  $\gamma\delta$ . Si tratta di una sottopopolazione di linfociti T che si differenzia per l'espressione di una forma di TCR costituita dalle catene  $\gamma$  e  $\delta$ , piuttosto che  $\alpha$  e  $\beta$ , e per la capacità di indurre un danno cellulare attraverso il rilascio di granzima B e INF- $\gamma$ . Questi linfociti sono maggiormente rappresentati nei pazienti con epatite autoimmune, si identificano per lo più a livello epatico e mostrano elevata reattività nei confronti degli epatociti<sup>14</sup>. È probabile che abbiano una funzione nell'aggressione epatica, nell'attivazione e nella perpetuazione del danno. Queste ipotesi sarebbero in parte corroborate dal riscontro nei pazienti di livelli

significativamente più alti di INF- $\gamma$  e granzima B che, inoltre, si accompagnano ad iperbilirubinemia ed aumento delle transaminasi<sup>44</sup>.

Infine, i monociti prelevati dal sangue periferico dei pazienti con epatite autoimmune producono, rispetto ai controlli, una quantità più alta di IL-10 e TNF $\alpha$ , esprimono maggiormente recettori Toll-like 4 e risultano ampiamente rappresentati negli infiltrati portal e periportal<sup>43</sup>.

Considerando che i T-reg sono numericamente e funzionalmente compromessi, il danno epatico è sostenuto ininterrottamente da tutti i sopraelencati meccanismi.

**Figura 2:** Meccanismi di danno epatico.



Tratto da: R. Liberal et al. Autoimmune hepatitis: A comprehensive review. Journal of autoimmunity.2013

### ***1.1.4. Manifestazioni cliniche***

I due tipi di epatite autoimmune si distinguono sulla base del riscontro di uno specifico pattern autoanticorpale. L'epatite autoimmune di tipo 1 è caratterizzata da anticorpi anti-muscolo liscio (SMA) e/o anti-nucleari (ANA); l'epatite autoimmune di tipo 2 da anticorpi anti microsoma di fegato e di rene (LKM-1) e/o anti citosol epatico (LC-1). Mentre l'epatite autoimmune di tipo 1, come precedentemente accennato, è una malattia che interessa sia adulti che i bambini, l'epatite autoimmune di tipo 2 colpisce solo l'età pediatrica. Nel bambino l'età media di diagnosi è di circa 10 anni per il tipo 1 e di 7 anni per il tipo 2.

L'esordio mostra segni di aggressività variabile a cui conseguono un ampio spettro di quadri clinici da quello asintomatico, a quello di insufficienza epatica acuta con encefalopatia.

- **Epatite acuta.** Nel 40% dei casi la malattia è apparentemente indistinguibile da un'epatite acuta virale con malessere, nausea, anoressia, vomito, dolore addominale seguito dalla comparsa di ittero generalizzato, urine scure e feci decolorate. In alcuni pazienti l'epatite autoimmune di tipo 2 esordisce con un quadro di insufficienza epatica acuta ed, eventualmente, encefalopatia<sup>45</sup>.
- **Esordio insidioso con malessere ed ittero ingravescente.** Nel 25% dei casi si ha un esordio clinico aspecifico con astenia, perdita di peso ed ittero recidivante, con fasi ingravescenti o di miglioramento spontaneo. Tale quadro talvolta può sottendere una condizione di epatite cronica resa evidente dal riscontro di epatomegalia e/o splenomegalia di consistenza aumentata.
- **Esordio fortuito.** Nel 10-15% dei soggetti l'epatite autoimmune si presenta in maniera asintomatica e viene diagnosticata a seguito del riscontro fortuito di epatomegalia dura con eventuale splenomegalia, oppure da splenomegalia isolata o semplicemente da un aumento delle aminotransferasi.
- **Esordio con sintomi correlati ad una complicanza della malattia epatica.** Nel 10% dei pazienti l'epatite si rende clinicamente evidente attraverso solo attraverso le complicanze di una epatite cronica già evoluta in cirrosi quali ascite e/o emorragia digestiva da varici esofagee secondarie ad una ipertensione portale.

In considerazione delle diverse modalità di esordio dell'epatite autoimmune, la malattia dovrebbe essere sospettata ed esclusa in tutti i bambini che presentano un quadro di epatopatia duratura o severa.

L'epatite autoimmune presenta un decorso fluttuante, con fasi di riesacerbazione e remissione, caratteristiche che possono ritardarne la diagnosi. Se non trattata, il quadro clinico è quello di una malattia severa caratterizzata da epatomegalia generalmente persistente e di consistenza aumentata, da splenomegalia in una metà dei casi ed ittero e ascite in una minoranza.

Nel 20% dei pazienti con epatite autoimmune sono associate una o più manifestazioni extraepatiche autoimmuni o immunomEDIATE; nella *tabella 2* sono riportate le più frequenti. In questi casi, pur essendo il motivo della visita medica una condizione extra-epatica, l'epatomegalia e l'epatocitolisi si riscontrano fin dall'esordio e indirizzano la diagnosi. Una condizione particolare è rappresentata dalla già citata ***sindrome polighiandolare autoimmune di tipo 1 (APECED)*** caratterizzata da candidiasi muco-cutanea, ipoparatiroidismo autoimmune, adrenalite autoimmune con insufficienza surrenalica, vitiligo, alopecia e distrofia ungueale. Questa sindrome nel 10-20% dei casi si associa ad una epatite autoimmune con reattività agli anti- LKM atipica, diretta verso il citocromo CYP1A2 e CYP2A6. Si tratta di una malattia rara, con prevalenza di 1-9 casi su 100.000.000 abitanti, più frequente in Finlandia (prevalenza di 1/25.000) e nella Francia nord occidentale (prevalenza 1/500.000). La malattia esordisce durante il primo decennio di vita con i segni di una candidiasi recidivante che interessa più di frequente la mucosa del cavo orale e le unghie, e meno spesso i genitali e la cute. Seguono gradualmente le manifestazioni cliniche di endocrinopatie autoimmuni. La più frequente è rappresentata dall'ipoparatiroidismo, identificata fino al 96% dei casi, seguita dall'insufficienza surrenalica, descritta nel 78% dei pazienti. Tuttavia le componenti endocrine della malattia possono non manifestarsi fino alla quarta decade di vita, rendendo necessaria una sorveglianza continua. Può essere riscontrata la presenza di insufficienza ovarica, mentre più raramente di diabete mellito di tipo 1, di tiroidite autoimmune o di ipofisite anteriore. È presente un'ampia variabilità fenotipica all'interno della stessa famiglia ed il numero di segni e sintomi è molto variabile. Di fatti, alle manifestazioni cliniche delle endocrinopatie possono accompagnarsi altri disturbi immunomediati tra i quali l'alopecia, la vitiligine, l'ipoplasia dello smalto dei denti, la distrofia ungueale, la cheroco congiuntivite, la sclerosi



della membrana timpanica e la gastrite atrofica che può poi condurre ad un'anemia perniciosa. In alcuni pazienti si sviluppano epatite autoimmune, malassorbimento intestinale, asplenismo, acalasia e coleliatiasi. Generalmente il numero degli organi affetti aumenta con il passare del tempo. La diagnosi di basa sulla presenza di almeno due della manifestazioni cliniche della triade sintomatologica: candidiasi muco-cutanea, ipoparatiroidismo e insufficienza surrenalica. Nei casi in cui un collaterale del paziente sia affetto dalla sindrome è sufficiente uno solo dei tre criteri per sospettare la diagnosi, che deve essere poi confermata dall'analisi molecolare. La terapia è sostanzialmente sintomatica. La prognosi è variabile e può essere aggravata dal carcinoma a cellule squamose del cavo orale e dell'esofago, da una sepsi, da un'epatite fulminante, da un'insufficienza renale dovuta a nefrite interstiziale o da un coinvolgimento dell'apparato respiratorio.

Infine, è nota l'associazione tra malattie autoimmuni del fegato e celiachia, una recente meta-analisi riporta che un terzo dei bambini con diagnosi di celiachia presenta un rilevante aumento delle transaminasi<sup>46</sup>. Questo riscontro può essere occasionale, non accompagnato da alcun segno o sintomo di epatopatia, ma associato ad un reperto istologico di infiammazione ed infiltrazione linfocitaria portale e lobulare con iperplasia delle cellule di Kupffer. Questa condizione di danno epatico glutine-sensibile e glutine-dipendente è definita "*epatite celiaca*" ed è caratterizzata dalla normalizzazione degli enzimi epatici con l'esclusione del glutine dalla dieta.

La prevalenza della celiachia, inoltre, negli adulti con epatopatia cronica è di circa 15 volte quello della popolazione generale. La celiachia può in particolare essere associata a malattie croniche del fegato a patogenesi autoimmune quali la cirrosi biliare primitiva, la colangite sclerosante primitiva, l'epatite autoimmune e tutte le condizioni di overlap tra queste entità cliniche. Uno studio retrospettivo multicentrico sviluppato in ambito SIGENP, ha confermato questi dati anche nella popolazione pediatrica rafforzando anzi la convinzione che l'epatopatia autoimmune sia una complicanza extraintestinale "privilegiata" della malattia celiaca. Questo studio ha ritrovato, infatti, su 140 pazienti pediatrici con malattie autoimmuni del fegato, seguiti in Italia presso centri specializzati in malattie del fegato pediatriche, una prevalenza di malattia celiaca di oltre il 16%. L'epatite autoimmune era la condizione maggiormente prevalente, con casi più rari di colangite autoimmune. In questi casi, la diagnosi di celiachia, precede solitamente quella di malattia

autoimmune del fegato, anche se è possibile fin dall'inizio rilevare un'alterazione degli enzimi epatici. È quindi sempre opportuna la ricerca degli autoanticorpi caratteristici di malattie autoimmuni del fegato, al fine di non confondere queste condizioni con l'epatite celiaca<sup>47</sup>. Una minor percentuale di pazienti con malattia infiammatoria epatica, pur non manifestando alcun sintomo o segno suggestivo, presenta una condizione di celiachia silente. La diagnosi in questi casi può avvenire solo dopo un fortuito screening sierologico, mentre in altri casi, il riscontro di un'anemia sideropenica refrattaria suggerisce la presenza di un malassorbimento ed induce il clinico ad approfondire le ricerche. Un recente studio ha evidenziato come l'epatite autoimmune associata a celiachia presenti, rispetto alle forme "classiche", una miglior outcome a lungo termine con più alte percentuali di remissione persistente alla sospensione della terapia<sup>48</sup>.

Le complicanze dell'epatite autoimmune sono comuni alle altre epatopatie croniche: in alcuni pazienti, prevalentemente adulti, nonostante la terapia immunosoppressiva è possibile progressione della malattia cronica alla cirrosi, e da quest'ultima ad un epatocarcinoma. La cirrosi rappresenta una *conditio sine qua non* per lo sviluppo del carcinoma<sup>49</sup>; questa complicanza è comunque poco frequente rispetto alle altre epatopatie.

**Tabella 1.** Aspetti clinici delle principali forme di epatite autoimmune

	<b>EAI-1</b>	<b>EAI-2</b>	<b>EAI Sieronegativa</b>	<b>Sindrome da overlap EAI-colangite Autoimmune</b>
<b>Età di esordio</b>	Ad ogni età, ma prevalentemente nell'adolescenza	Infanzia e comunque in età prepuberale	Ad ogni età	Prevalentemente in corso della adolescenza
<b>Sintomi all'esordio</b>	Generalmente modesti	Epatite acuta sintomatica		Spesso correlati alla malattia infiammatoria cronica intestinale associata
<b>Cirrosi all'esordio</b>	Frequente	Rara	Rara	Possibile
<b>Ipergammaglobulinemia</b>	Frequente	Rara	Possibile	Possibile
<b>Lesioni biliari</b>	Di modesta entità	Assenti	Possibili	Costanti
<b>Autoanticorpi caratterizzanti</b>	ANA, SMA, pANCA, SLA	LKM1, LC1	Assenti	ANA, SMA, p/cANCA, SLA
<b>Malattie extraepatiche (eccetto MICI)</b>	Frequenti	Frequenti	Possibili	Possibili
<b>MICI associata</b>	Possibile	Rara	Rara	Quasi costante
<b>Risposta al trattamento immunosoppressivo</b>	Generalmente buona	Buona con rare eccezioni	Generalmente buona	Incerta

Tratto da: Sciveres et al. Epatite autoimmune:una terapia non sempre facile. Prospettive in Pediatria. Vol. 42 N.65 Gennaio-Marzo 2012

**Tabella 2.** Malattie autoimmuni associate all'epatite autoimmune

	<b>EAI-1</b>	<b>EAI-2</b>
<b>Emopatie</b> Trombocitopenia Anemia emolitica	Presenti	Presenti
<b>Endocrinopatie</b> Malattia di Graves Tiroidite autoimmune Diabete di tipo I	Presenti	Frequenti
<b>Altre</b> Vitiligo Vasculiti Glomerulonefriti Connettiviti	Presenti	Presenti
<b>APECED (poliendocrinopatia autoimmune)</b>	Non presente	Presente (associata a mutazione del gene AIRE)

Tratto da: Sciveres et al. Epatite autoimmune:una terapia non sempre facile. Prospettive in Pediatria. Vol. 42 N.65 Gennaio-Marzo 20

### ***1.1.5. Aspetti bioumorali***

Sul piano bioumorale le epatiti autoimmuni sono accompagnate da anomalie di laboratorio aspecifiche, come l'ipertransaminasemia, e dalla più sensibile presenza di caratteristici autoanticorpi. Generalmente l'incremento dei valori di aspartato-amino-transferasi (AST) e alanino-amino-transferasi (ALT) è più marcato rispetto a quello della bilirubina e delle gamma-glutamil transpeptidasi ( $\gamma$ GT); queste ultime, invece, non si innalzano in corso di epatite autoimmune di tipo 2 e nel tipo 1 a lesioni minime. L'elettroforesi delle proteine sieriche mostra una ipergammaglobulinemia policlonale con valori anche di 6-7 g/dl, caratterizzata da un aumento prevalente delle IgG. Questo reperto è costante nell'epatiti autoimmuni di tipo 1, incostante nel tipo 2. In quest'ultimo si può rilevare invece un deficit parziale o completo di IgA e/o un basso livello di C4, geneticamente determinato. L'albuminemia è alterata nella misura in cui è compromessa la funzione biosintetica del fegato o in caso di ascite. L'attività protrombinica e gli altri indici di sintesi sono generalmente ridotti, anche in modo marcato.

### ***Autoanticorpi***

Il riscontro degli autoanticorpi rappresenta il criterio condiviso per la differenziazione dei due tipi di epatite autoimmune, rispettivamente: ANA e/o SMA, nell'epatite autoimmune di tipo 1; anti LKM-1 e/o anti LC-1, nell'epatite autoimmune di tipo 2. Altri autoanticorpi di rilevanza diagnostica sono rappresentati da anti-SLA (antigene epatico solubile), anti-LP (antigene epatico e pancreatico), anti-ASGPR (recettore della asialo-glicoproteina) e gli ANCA (anti citoplasma dei neutrofili)<sup>50, 51</sup>. Essi possono essere rilevati in ambo le forme di epatite autoimmune. La presenza degli ANCA è registrata frequentemente, tuttavia questo riscontro è, ai fini diagnostici, scarsamente sensibile e specifico. Nell'epatite autoimmune di tipo 1, sebbene sia nota l'associazione tra anticorpi non-organo specifici, come gli ANA, e gli anticorpi anti-muscolo liscio (SMA), appare ancora sconosciuta la loro esatta funzione nella patogenesi del danno.

La reattività anticorpale ha un andamento fluttuante nel corso della malattia: si riduce fino a negativizzarsi durante le fasi di remissione, riprende durante le recidive. Il titolo

anticorpale, sebbene assuma significato diagnostico, non risulta essere predittivo dell'aggressività della malattia, del rischio di ricaduta, della possibilità di remissione, né modifica l'intervento terapeutico.

Le linee guida per la ricerca degli autoanticorpi sono state fornite nel 2004 dall'*International Autoimmune Hepatitis Group (IAHG)*. La tecnica suggerita è rappresentata dall'immunofluorescenza condotta su sezioni di fresche di fegato, rene e parete gastrica di ratto. L'uso dei tre tessuti permette, infatti, di indagare simultaneamente la presenza degli autoanticorpi caratterizzanti le malattie autoimmuni del fegato.

**Anticorpi anti-nucleo (ANA):** La presenza di questi autoanticorpi è diagnostica per l'epatite autoimmune di tipo 1. Gli ANA sono quasi sempre associati agli anticorpi anti muscolo liscio e solo nel 4-8% dei casi compaiono isolatamente<sup>2</sup>. L'immunofluorescenza mostra un classica colorazione a livello nucleare evidente su sezione di rene, stomaco e fegato di ratto. Tuttavia, la linea cellulare Hep2 è quella maggiormente utilizzata per rilevare la presenza di questi autoanticorpi, dato l'elevato rapporto nucleo/citoplasma; secondo alcuni, queste cellule non dovrebbero essere impiegate ai fini di uno screening per le patologie autoimmuni, per via dell'alto tasso di positività nella popolazione sana. Il pattern di immunofluorescenza può variare nello stesso soggetto nel corso della malattia; si possono riscontrare le varietà omogenea (60%), punteggiata (20%), omogenea-punteggiata (10%), centromerica (9%) e perinucleare (6%). I target di questi anticorpi sono eterogenei, comprendendo DNA a doppio e singolo filamento, sn-RNP, centromeri, istoni, cromatina e ciclina A. Il meccanismo che conduce alla produzione degli ANA non è chiaro, si ipotizza che il danno epatico conduca al rilascio di antigeni nucleari oppure che vi sia una perdita di tolleranza immunologica da parte dei linfociti B. Gli ANA si ritrovano anche in altre malattie autoimmuni tra cui la cirrosi biliare primitiva, tipica dell'età adulta, nel lupus eritematoso sistemico, da cui la prima definizione di "epatite lupoide", nella sindrome di Sjögren, nella sclerosi sistemica e, a bassi titoli, in alcuni casi di epatite infettiva e di steatosi non alcolica (NAFL)<sup>52</sup>. Data la scarsa specificità di questi autoanticorpi, il cut-off del titolo degli ANA viene fissato a 1:100.

**Anticorpi anti-muscolo liscio (SMA):** Gli anticorpi anti-muscolo liscio sono presenti nel 50% dei casi di epatite autoimmune. Vengono dosati attraverso tecniche di immunofluorescenza su frammenti di stomaco, rene e fegato di ratto. Si legano in maniera

uniforme alla tonaca muscolare propria della mucosa gastrica e nel tessuto renale a livello del mesangio. Esaminando la fissazione renale è possibile identificare alcuni pattern specifici: V (da vessels), G (da glomeruli) e T (da tubuli). Questi pattern possono essere variamente combinati tra di loro e le associazioni VG e VGT risultano essere quelle più di frequentemente attribuite all'epatite autoimmune di tipo 1. I target di questi anticorpi sono rappresentati da proteine del citoscheletro, sia l'actina, ma anche la desmina, la vimentina e scheletrina<sup>51</sup>. Il pattern VGT corrisponde alla F-actina, o detto anche pattern a microfilamento quando osservato su colture di fibroblasti. Sebbene i sieri SMA<sup>+</sup> riconoscano maggiormente l'actina come antigene specifico, un 20% dei pazienti non presenta questo pattern, ciononostante non può essere esclusa la diagnosi di epatite autoimmune di tipo 1. Gli anticorpi anti-F actina sembrano aver nel piccolo paziente una elevata specificità per l'epatite autoimmune di tipo 1 e la loro presenza assieme agli ANA correlerebbe con una malattia ad esordio precoce e più severa<sup>53</sup>. Infine, gli SMA sono stati rilevati in altre epatopatie oltre che in malattie ad eziologia infettiva e reumatica<sup>54</sup>.

**Anticorpi anti-microsoma di fegato/rene tipo 1 (anti-LKM):** Rappresentano l'elemento caratteristico dell'epatite autoimmune di tipo 2. Gli anti-LKM-1 mostrano un tipico pattern di fluorescenza citoplasmatico su epatociti, su cellule tubulari renali prelevate dalla porzione P3 del tubulo prossimale, ma non su cellule della parete gastrica. Quest'ultima caratteristica consente di distinguere gli anti-LKM-1 dagli anticorpi anti-mitocondrio (AMA), diagnostici, invece, per la cirrosi biliare primitiva. Inoltre, l'introduzione di test basati sul riconoscimento degli specifici antigeni purificati, citocromo P450 2D6 per anti-LKM-1 e piruvato deidrogenasi per gli AMA, ha permesso di fugare ogni dubbio. Nell'epatite autoimmune di tipo 2 gli anti-LKM-1 riconoscono specifici epitopi, di questi i principali sono rappresentati da CYP2D6<sub>193-212</sub> nel 93% dei pazienti, CYP2D6<sub>257-269</sub> nell'85%, CYP2D6<sub>321-351</sub> nel 53% e due epitopi minori CYP2D6<sub>410-429</sub> e CYP2D6<sub>373-389</sub> nel 13% e 7%. Gli anti-LKM-1 sono stati ampiamente studiati poiché ritenuti alla base di processi di mimetismo molecolare. I sieri prelevati da pazienti affetti da HCV presentano nel 5% dei casi positività agli anti-LKM-1; questi anticorpi riconoscono nel 50% dei casi l'epitopo CYP2D6<sub>193-212</sub> che presenta omologie con la proteina NS5B dell'HCV<sup>28</sup>. Vengono inoltre riportate analogie tra altre sequenze amminoacidiche di CYP2D6 e quelle delle proteine E1 di HCV, IE175 di HSV e la sequenza 130-135 di CMV<sup>55</sup>.

Conosciamo altri tipi di anticorpi anti-LKM: gli anti-LKM-tipo 2 e gli anti LKM-tipo 3. I primi riconoscono il citocromo CYP2C9 e sono associati ad epatiti da farmaci, come l'acido tienilico; i secondi, possono riscontrarsi sia in caso di infezione da virus dell'epatite D (HDV) che, nel 19% dei casi, di epatite autoimmune di tipo 2<sup>56</sup>. Essi hanno come target i membri della famiglia di enzimi UDP-glucoronil transferasi tipo 1. Infine, gli anticorpi contro il citocromo CYP1A4, che sono stati descritti nell'epatiti da idralazina, vengono reperiti anche in quelle forme di epatite autoimmune associati alla sindrome APECED<sup>57</sup>.

**Anticorpi anti citosol-epatico tipo 1 (anti LC-1):** Sono presenti fino al 50% dei casi in associazione agli anti-LKM-1, ma possono rappresentare anche l'unico marker dell'epatite autoimmune di tipo 2<sup>58</sup>. Inoltre, sono stati occasionalmente titolati assieme agli SMA nell'epatite autoimmune di tipo 1 e, nell'adulto, nelle infezioni da HCV<sup>59</sup>. Gli anti-LC-1 vengono identificati su cellule di rene, su epatociti e su cellule di parete gastrica. Gli epatociti, in particolare, mostrano una caratteristica fluorescenza citoplasmatica e, a livello del lobulo epatico, la zona centrolobulare appare meno interessata rispetto alle altre poiché generalmente oscurata dalla presenza degli anti-LKM-1. Gli anti-LC-1 riconoscono l'enzima formio-transferasi ciclodeamidasi (FTCD), enzima coinvolto nel metabolismo dei folati ed ampiamente rappresentato a livello epatico. Occasionalmente l'anticorpo anti LC-1 può rappresentare l'unico marker identificabile nel corso di una epatite autoimmune.

**Anticorpi anti antigene epatico solubile / antigene epatico-pancreatico (anti SLA/LP):** Originariamente descritti come due tipi autoanticorpi differenti, gli anti-SLA/LC riconoscono lo stesso autoantigene e sono identificati, a differenza dei precedenti autoanticorpi, attraverso tecniche radioimmunologiche o ELISA. L'antigene epatico solubile è una proteina di circa 50 kDa, omologa al 99% ad una proteina associata al tRNA soppressore UGA, la quale sembra essere coinvolta nel metabolismo della selenocisteina 14-15. La citocheratina 8, la citocheratina 18 e il glutatione S-transferasi sono stati indicati come bersagli principali della reattività SLA, ma ciò non viene confermato dai tutti gli studi<sup>60-62</sup>. La presenza degli anti-SLA, sebbene sia stata proposta come hallmark per un terzo tipo di epatite autoimmune, non è riconosciuta dalla International Autoimmune Hepatitis Group (IAHG). Gli anti-SLA si riscontrano in circa il 50% dei bambini con epatite autoimmune di tipo 1 e tipo 2 e si associano ad un decorso più severo della

malattia; si consiglia il dosaggio di questi anticorpi ogni qual volta vi sia un quadro di epatite sieronegativa.

**Anticorpi anti citoplasma dei neutrofili (ANCA):** Gli ANCA vengono distinti in due tipologie in funzione del pattern di fluorescenza mostrato: i cANCA si dispongono secondo un disegno di tipo granulare e diffuso nel citoplasma (pattern citoplasmatico), mentre i pANCA si legano alla cellula bersaglio attorno al nucleo (pattern perinucleare). I cANCA identificano l'enzima proteinasi-3 (PR3) e si associano alla granulomatosi di Wegner. I pANCA si dirigono verso l'enzima mieloperossidasi (MPO) e si dosano nella poliangioite microscopica. I pANCA sono stati identificati nella epatite autoimmune di tipo 1, ma sono assenti in quella di tipo 2<sup>63</sup>. Compaiono, inoltre, nella colangite sclerosante primitiva e nella rettocolite ulcerosa. In questi casi si riscontra un pattern atipico, con interessamento della membrana nucleare, perciò il termine pANNA (peripheral anti-nuclear neutrophil antibody). I pANNA sembrerebbero riconoscere una proteina di 50 kDa presente sulla membrana nucleare dei neutrofili, probabilmente rappresentata da un costituente del complesso del poro nucleare, come la tubulina; tuttavia, sono necessari ulteriori studi per confermare questo dato<sup>64</sup>.

**Anticorpi anti-recettore delle asialo-glicoproteine:** La ASGPR rappresenta l'unico autoantigene conosciuto; come in precedenza descritto, esso è espresso, sulla membrana degli epatociti. Gli anticorpi anti-ASGPR vengono dosati attraverso tecniche radioimmunologiche o immunoenzimatiche. Si rileva un aumento di questi anticorpi nell'88% dei pazienti con epatite autoimmune, assieme agli ANA, gli SMA o gli anti-LKM-1<sup>51</sup>. Sono presenti in circa tre quarti dei bambini con epatite autoimmune di tipo 1 e in un terzo di tipo 2. Gli anti-ASGPR non sono, però, specifici e possono innalzarsi anche in corso di epatiti virali o farmaco indotte e nella cirrosi biliare primitiva, queste ultime due più tipiche dell'adulto. I livelli di anti-ASGPR risultano fortemente correlati con l'aggressività della malattia, l'ipergammaglobulinemia e riferiscono dell'efficacia del trattamento. Tuttavia, poiché poco specifici e data la mancata disponibilità di test attendibili per il dosaggio, gli anti-ASGPR hanno una limitata utilità ai fini diagnostici<sup>51</sup>.



### ***1.1.6. Quadro istopatologico***

La biopsia epatica è un fondamentale elemento di supporto diagnostico, soprattutto in caso di epatiti ad esordio acuto o nelle forme sieronegative. A condizione che l'emostasi lo permetta, dovrebbe essere correntemente eseguita al fine di avvalorare la diagnosi di epatite autoimmune, per stadiare le lesioni e per valutare eventuali componenti di overlap. Esistono due differenti tecniche per ottenere campioni di parenchima epatico, la biopsia a cuneo (*wedge biopsy*) e la biopsia con ago (*needle biopsy*). La biopsia con ago percutanea è la tecnica più rapida, sicura e maggiormente applicata nello studio dell'epatopatie. Nonostante la biopsia sia considerata il *gold standard* per la diagnosi di epatite autoimmune, esistono delle limitazioni rappresentate dall'errore di campionamento e dalla variabilità di interpretazione osservatore dipendente. L'errore di campionamento si riduce in modo proporzionale all'incremento delle dimensioni del campione bioptico. Per la diagnosi accurata di epatopatia è necessario un frustolo della lunghezza di 1,5-2,5 cm e dello spessore di 1,2-2 mm<sup>65</sup>. La variabilità di interpretazione osservatore dipendente viene in parte appianata dall'impiego di sistemi classificativi che garantiscono un accordo inter-osservatore in una percentuale variabile tra il 70-90% e un accordo intra-osservatore tra il 60 e 90 %.<sup>66</sup>

Il quadro istopatologico che identifica l'epatite autoimmune è rappresentato dall'*epatite di interfaccia*, tuttavia non si tratta di un reperto patognomônico. La valutazione istopatologica mostra cellule infiammatorie che, partendo dagli spazi portali, invadono il parenchima adiacente e causano necrosi degli epatociti periportalì. Esse superano la lamina limitante e tramite ponti di necrosi occupano altri spazi portali o si dirigono verso la vena centrolobulare, fino a procurare il collasso della trama reticolare. L'infiltrato si compone di linfociti T, polimorfonucleati e plasmacellule. Queste ultime non si osservano nelle altre forme di epatite e sono perciò ritenute indispensabili per la diagnosi di epatite autoimmune. Tra i polimorfonucleati possono essere presenti eosinofili, in particolare nei casi associati a celiachia<sup>67</sup>. I linfociti T CD4+ sono maggiormente rappresentati rispetto ai T CD8+ e suppressor ; mentre i primi si riscontrano prevalentemente nel tratto portale, i secondi sono impegnati nel fronte di necrosi epatocitaria<sup>68</sup>. Il danno biliare, sebbene non tipico di epatite autoimmune, può riscontrarsi in forma limitata fino al 25% dei casi. Il perdurare

dell'epatite di interfaccia e della necrosi a ponte è segno di un danno epatico evolutivo, che progredisce fino alla deposizione di tessuto fibroso. La fibrosi si estende, in modo analogo alla necrosi, dagli spazi portalì a quelli periportalì, fino alla formazione di setti tra i lobuli. Il danno può, infine, sfociare in cirrosi, in cui noduli proliferanti di dimensione irregolare sono separati da ampie cicatrici. Il grado di epatite cronica viene definito valutando l'attività necrotico-infiammatoria periportalì, l'entità della fibrosi e l'eventuale presenza di noduli di rigenerazione cirrotica. La presenza di cirrosi alla diagnosi varia dal 10% al 90% dei casi, in funzione della differenti casistiche. La variabilità di questo dato è giustificata dalla differente sensibilità dei metodi impiegati per la biopsia. L'epatite autoimmune può presentarsi anche in forma acuta, in questo caso la lesione centro lobulare è predominante ed è associata, a volte, al collasso della trama reticolare. In questo caso la presenza di necrosi epatocitaria, di follicoli linfoidi, del ricco infiltrato plasmacellulare e di una perivenulite suggeriscono la diagnosi. L'eventuale proliferazione duttale deve essere intesa come rigenerazione delle cellule progenitrici epatiche, in risposta al danno subito. Inoltre, col fine di effettuare una corretta diagnosi differenziale, attraverso indagini istochimiche è possibile per il patologo escludere malattie da accumulo di metallo, come il rame o il ferro, o l'accumulo intracellulare di proteine, come l' $\alpha 1$ -anti-tripsina.

In definitiva l'esame istopatologico fornisce al clinico una fotografia dell'epatopatia mediante la determinazione dell'attività necroticoinfiammatoria o "*grading*" e del grado di fibrosi o "*staging*". Esistono più sistemi semiquantitativi per la stima del danno istologico, ma tre sono quelli maggiormente utilizzati nella pratica clinica. Il sistema di Knodell, introdotto nel 1981, propone un punteggio basato sull'indice numerico di attività istologica (*numerical histologic activity index, HAI*). L'indice numerico di attività istologica del campione biotico ha come addendi il valore attribuito all'attività necrotico infiammatoria e quello attribuito alla fibrosi. Tuttavia, raggruppare *grading* e *staging* in un unico indice rappresenta il limite principale di questo sistema: tali parametri descrivono lesioni di tipo differente ed hanno una diversa implicazione prognostica.<sup>69</sup> La necessità di descrivere in modo dedicato il grado di fibrosi ha portato allo sviluppo degli altri tre sistemi di punteggio. Nel 1994 Ishak e colleghi presentarono una revisione al modello di Knodell apportandovi alcune modifiche: venne introdotta una scala continua di valori che descrivono il grado di attività e lo stadio di fibrosi come due parametri separati.<sup>70</sup> La valutazione del *grading* viene effettuata considerando separatamente le diverse forme di

necrosi ed attribuendo un punteggio massimo di 18 per la componente necro-infiammatoria (*Tabella 3*). La valutazione dello *staging* viene effettuata utilizzando una scala continua di valori e attribuendo un punteggio massimo di 6 per lo stadio di fibrosi (*Tabella 4*). Infine, il più recente sistema classificativo METAVIR, proposto dall'omonimo gruppo di studio cooperativo francese, prevede come il sistema Ishak due punteggi separati per la valutazione dell'attività istologica e per lo stadio di fibrosi. Un recente studio di confronto tra Ishak e METAVIR ha dimostrato una concordanza quasi perfetta nella definizione dello stadio di fibrosi, ma non nella valutazione dell'attività necro-infiammatoria, probabilmente per via dell'impiego di parametri diversi nella definizione del *grading*. In particolare il sistema METAVIR non descrive il grado di infiammazione portale, per cui alcuni autori consigliano per un *grading* e *staging* più accurato l'adozione del sistema Ishak, in specie negli stadi intermedi di malattia, in cui lo sviluppo della cirrosi non è ancora conclamato ma il grado di fibrosi è già significativo<sup>71</sup>.

**Tabella 3. Grading istologico secondo Ishak**

Caratteristiche istologiche	Gravità	Punteggio
<i>Piecmeal necrosis</i>	<i>Assente</i>	<b>0</b>
	<i>Lieve</i>	<b>1</b>
	<i>Lieve/Moderata</i>	<b>2</b>
	<i>Moderata</i>	<b>3</b>
	<i>Severa</i>	<b>4</b>
<i>Bridging necrosis</i>	Assente	<b>0</b>
	Necrosi confluyente focale	<b>1</b>
	Necrosi in zonula 3 (in alcune aree)	<b>2</b>
	Necrosi in zonula 3 (in numerose aree)	<b>3</b>
	Necrosi in zonula 3 ed occasionali ponti porto-centrali	<b>4</b>
Necrosi focale litica, apoptosi, infiammazione focale	Assente	<b>0</b>
	Un solo focus	<b>1</b>
	Da 2 a 4 foci	<b>2</b>
	Da 5 a 10 foci	<b>3</b>
	Più foci	<b>4</b>
Infiammazione portale	Nessuna	<b>0</b>
	Lieve	<b>1</b>
	Moderata	<b>2</b>
	Moderata/marcata	<b>3</b>
	Marcata	<b>4</b>
Punteggio massimo		<b>18</b>

**Tabella 4. Staging istologico secondo Ishak**

Caratteristiche istologiche	Punteggio
Assenza di fibrosi	<b>0</b>
Ingrandimento fibrotico di alcuni spazi portale	<b>1</b>
Ingrandimento fibrotico della maggior parte degli portali	<b>2</b>
Ingrandimento fibrotico della maggior parte degli spazi portali con occasionali ponti porto-portali	<b>3</b>
Ingrandimento fibrotico della maggior parte degli spazi portali con occasionali ponti sia porto-portali che porto-centrali	<b>4</b>
Numerosi ponti porto-portali e porto-centrali con occasionali noduli	<b>5</b>
Cirrosi	<b>6</b>

### ***1.1.7. Diagnosi***

La diagnosi di epatite autoimmune in età pediatrica può essere formulata con relativa facilità quando la malattia si presenta con tutte le sue caratteristiche tipiche. Al contrario, una presentazione più subdola richiede maggiore capacità di interpretazione degli elementi clinici, sierologici ed istologici, nonché l'esclusione di altre forme di epatopatia. Ad eccezione della cirrosi biliare primitiva e della emocromatosi genetica, entrambe di pertinenza dell'adulto, occorre escludere le infezioni da virus epatotropi maggiori e minori, le epatopatie da farmaci, la malattia di Wilson, il deficit di  $\alpha$ 1-anti-tripsina ed alcune malattie metaboliche. Successivamente l'indagine richiede la ricerca di elementi suggestivi della patologia: la familiarità per malattie autoimmuni, in particolare nei parenti di primo grado, l'ipergammaglobulinemia di tipo iper-IgG, il deficit parziale o totale di IgA e la presenza di autoanticorpi non organo specifici, come ANA e SMA, rappresentano elementi debolmente suggestivi di epatite autoimmune. Elementi fortemente suggestivi sono costituiti dalla presenza di elevati livelli di aminotransferasi, di una patologia autoimmune associata all'epatite, di autoanticorpi non organo specifici ad alto titolo ( $>1:100$ ) o di anticorpi organo specifici, come anti-LKM-1 e/o anti LC-1. Qualora i reperti clinici non siano avvalorati dal riscontro dei tipici autoanticorpi, si procede alla ricerca degli anti-SLA. Infine la terapia immunosoppressiva, quale criterio *ex-adiuvantibus*, può essere attuata laddove il dubbio diagnostico dovesse persistere; in tal caso la risposta positiva alla terapia consente la diagnosi di epatite autoimmune sieronegativa. La biopsia permette di sigillare la diagnosi e, sulla base del grado di fibrosi evidenziato, di formulare la prognosi. Pertanto la valutazione istologica è obbligatoria, se l'emostasi lo consente.

A supporto del clinico, nel tempo sono stati forniti diversi *score diagnostici*. I primi criteri vennero proposti nel 1992, a Brighton, dalla IAIHG con l'intento di convenire su un elenco di elementi diagnostici che definisse in modo omogeneo l'epatite autoimmune. Venne inoltre elaborato uno score diagnostico numerico attraverso cui porre diagnosi certa o probabile di epatite autoimmune. Nel 1999, con la validazione di nuovi criteri su circa mille pazienti, al "Brighton report" vennero apportate delle modifiche<sup>72</sup>. (*Tabella 5*).

Infine, nel 2008 Hennes e collaboratori presentarono uno score diagnostico semplificato che si è dimostrato sensibile (88%), specifico (97%) e di facile applicabilità nella pratica

clinica. I criteri considerati sono costituiti da autoanticorpi tipici a titoli significativi, aumento delle IgG, istologia caratteristica e assenza di epatiti virali. Ognuno di questi elementi rappresenta, indipendentemente, un fattore predittore di epatite autoimmune<sup>73</sup>. Viene così calcolato un punteggio che consente di formulare una diagnosi probabile o definitiva di epatite autoimmune.

Alcuni studi hanno confrontato l'applicabilità in ambito pediatrico tra i criteri della IAHG del 1999 ed i criteri semplificati del 2008. Sebbene i criteri del 1999 presentino una elevata sensibilità e specificità, si sottolinea che questo sistema è stato concepito per l'adulto e che pertanto le correzioni apportate non sono utili in pediatria; ne sono esempio il consumo di alcolici e il rapporto tra fosfatasi alcalina e amino transferasi. D'altra parte, i criteri semplificati, pur presentando una specificità lievemente maggiore, mostrano una sensibilità minore, motivo per cui alcuni autori ne sconsigliano l'uso<sup>74</sup>.

Infine, considerando l'attività delle  $\gamma$ GT piuttosto che della fosfatasi alcalina è possibile identificare con maggiore specificità i pazienti da sottoporre a imaging biliare, selezionando in tal modo i casi di sindrome da overlap epatite autoimmune/colangite sclerosante autoimmune.

**Tabella 5.** *Punteggio (score) diagnostico per Epatite Autoimmune*

<b>Parametri</b>	<b>Punteggio</b>
<i>Sesso femminile</i>	2+
<i>Rapporto fosfatasi alcalina/AST (o ALT)</i>	
<1.5	2+
1.5-3.0	0
>3.0	2-
<i>Livelli di immunoglobuline IgG</i>	
>2.0 gm/dl	3+
1.5-2.0 gm/dl	2+
1.0-1.5 gm/dl	1+
< 1.0 gm/dl	0
<i>Titolo autoanticorpi ANA, SMA O LKMI</i>	
> 1:80	3+
1:80	2+
1:40	1+
< 1:40	0
Autoanticorpi AMA	4-
<i>Marcatore sierici di epatite virale</i>	
Presenti	3-
Assenti	3+
<i>Anamnesi di assunzione di farmaci</i>	
Presente	4-
Assente	1+
<i>Assunzione media giornaliera di alcool</i>	
< 25 gm/giorno	2+
> 60 gm/giorno	2-
<i>Istologia epatica</i>	
Epatite di interfaccia	3+
Infiltrato infiammatorio prevalentemente linfomonocitario	1+
Formazione di “rosette” dagli epatociti	1+
Nessuna delle precedenti	5-
Presenza di lesioni biliari	3-
Altre lesioni	3-
Presenza di malattie autoimmuni	2+
<i>Elementi addizionali</i>	
Positività per altri autoanticorpi correlati	2+
Presenza di HLA DR3 o DR4	1+
<i>Risposta alla terapia</i>	
Completa	2+
Presenza di ricadute	3+
<i>Interpretazione del punteggio</i>	
Pretrattamento	
Epatite autoimmune certa	>15
Epatite autoimmune probabile	10-15
Posttrattamento	
Epatite autoimmune certa	>17
Epatite autoimmune probabile	12-17

Tratto da: Alvarez et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. J Hepatol. 1999

### ***1.1.8.Terapia***

#### ***Il trattamento medico***

Il trattamento farmacologico dell'epatiti autoimmuni persegue due principali obiettivi: la normalizzazione della funzione epatocellulare ed il mantenimento di una condizione stabile di remissione, prevenendo in tal modo la cirrosi e le sue complicanze.

La maggior parte delle epatiti autoimmuni risponde rapidamente e drammaticamente alla terapia immunosoppressiva. Qualsiasi sia l'esordio, eccezione fatta per l'epatite fulminante, la malattia è sensibile alla terapia con prednisolone e azatioprina.

Prednisolone o prednisone e azatioprina costituiscono il cosiddetto *trattamento convenzionale*. Il corticosteroide può essere utilizzato inizialmente in monoterapia, associando solo dopo l'azatioprina, tuttavia, frequentemente, si preferisce sfruttare fin da subito una *terapia combinata* con entrambi i farmaci, per l'effetto "risparmiatore di steroidi" dell'azatioprina.

Il **corticosteroide** è somministrato al dosaggio di 1-2 mg/Kg/die, fino a un massimo di 60 mg/die in monoterapia e di 20-30 mg/die in terapia combinata; l'azatioprina alla dose iniziale di 1 mg/Kg/die, fino ad un massimo di 2,5 mg/Kg/die<sup>75</sup>.

I corticosteroidi, legando i recettori citoplasmatici (*Glucocorticoid Receptor, GR*), traslocano nel nucleo ed interagiscono con specifiche sequenze di DNA (*Glucocorticoid Responsive Elements, GRE*) situate nelle regioni regolatrici di specifici geni. L'interazione altera la velocità di trascrizione, causando induzione o repressione genica. Il risultato è l'inibizione della attivazione e della proliferazione dei linfociti T, attraverso cui si previene la sintesi di citochine proinfiammatorie, come interleuchina 2 e interleuchina 6. Nei pazienti in terapia si rilevano livelli più bassi di interferone  $\gamma$ , immunoglobuline ed interleuchina 4 e viene evidenziato un miglioramento della fibrosi epatica<sup>76, 77</sup>. Tuttavia, i corticosteroidi presentano un'emivita relativamente breve, pertanto l'inappropriata discontinuazione della terapia influisce sulla progressione del danno.

L'**azatioprina** è un pro-farmaco dal quale origina la 6-mercaptopurina, entrambe le molecole vengono convertite nel metabolita farmacologicamente attivo 6-tioguanina. I



meccanismi d'azione dell'azatioprina sono complessi e solo parzialmente sconosciuti: è noto che inibisce la proliferazione dei linfociti T, delle cellule T citotossiche e delle plasmacellule inducendo l'accumulo di nucleotidi tioguaninici con conseguente compromissione della sintesi del DNA e del RNA. L'azatioprina ha come caratteristica una lenta insorgenza dell'azione terapeutica, che necessita di 8-12 settimane per manifestarsi, e fino a 6 mesi per svilupparsi pienamente. È probabile che il meccanismo di accumulo dei nucleotidi sia lento e che ciò determini una dilatazione dell'intervallo di tempo tra l'inizio della terapia e la comparsa di una risposta ad essa.

La terapia farmacologica deve essere iniziata tempestivamente, appena raggiunto un convincimento diagnostico, anche in assenza di elementi istopatologici di marcata aggressività. La malattia del bambino è generalmente severa e presenta un elevato potenziale cirrogeno, anche a sei mesi dall'esordio.

Il trattamento dell'epatite autoimmune si articola in tre fasi. La prima fase si propone di indurre la remissione clinica e bioumorale della malattia con la scomparsa dei sintomi e segni clinici e la normalizzazione dei livelli di transaminasi, immunoglobuline e del tempo di protrombina. In una buona percentuale dei pazienti questi obiettivi si raggiungono in 6-8 settimane, anche se la completa normalizzazione dei parametri bioumorali può richiedere un tempo maggiore. Nei pazienti che esordiscono con grave insufficienza epatica l'approccio prevede: steroide in monoterapia a 2 mg/Kg, oppure la terapia combinata prednisone 1 mg/Kg, fino a 40 mg/die, e **ciclosporina** con una ciclosporemia bersaglio di  $200 \pm 50$  ng/ml. Il 10% dei casi mostra una scarsa risposta, ragion per cui si procede con una terapia di salvataggio con tripla immunosoppressione: prednisone, ciclosporina e micofenolato-mofetile, considerando attentamente il rischio di infezione. La refrattarietà anche a questo trattamento è una indicazione al trapianto di fegato in urgenza.

La seconda fase ha come obiettivo il mantenimento della remissione: lasciando invariata la dose di azatioprina, si riduce progressivamente la somministrazione dello steroide fino alla dose più bassa possibile. Si consiglia, inoltre, il passaggio alla corticoterapia a giorni alterni con il fine di attenuarne gli effetti avversi soprattutto sull'accrescimento. Lo schema prevede un dosaggio di 2 mg/ Kg/die il primo giorno e una riduzione della dose il secondo giorno, di 5 mg ogni 3-4 settimane, fino al raggiungimento di 2mg/kg a giorni alterni. In trattamento così descritto dovrebbe essere continuato per un periodo di 5-10 mesi. Una eventuale sospensione della terapia in questa fase espone ad elevato rischio di recidiva

nonché di evoluzione della malattia. Secondo alcuni Autori la remissione andrebbe necessariamente documentata istologicamente, tuttavia l'argomento è dibattuto poiché una remissione istologica non è predittiva di una assenza di recidive<sup>78</sup>. La terza fase del trattamento ha il fine di prevenire le recidive della malattia. Si prosegue con il mantenimento dell'azatioprina e con la riduzione ulteriore dello steroide. I dosaggi minimi di steroide necessari sono variabili tra i pazienti, sebbene vi sia una proporzionalità inversa tra le dosi utili e l'età del paziente stesso. Lo schema prevede la riduzione dello steroide di 2,5 mg a giorni alterni ogni 4-6 settimane, fino a raggiungere 1 mg/Kg a giorni alterni; si riduce ulteriormente di 1-2,5 mg ogni 2-6 mesi, mantenendo la remissione bioumorale, fino a dosi comprese tra 0,9 e 0,2 mg/Kg a giorni alterni. È opportuno che ogni cambiamento della dose sia accompagnato da un attento monitoraggio clinico e bioumorale, perché la terapia sia al meglio modellata sull'andamento e le caratteristiche della malattia. In pediatria un ruolo importante nel monitoraggio terapeutico è assunto dal dosaggio del titolo autoanticorpale e delle IgG, poiché la fluttuazione dei livelli plasmatici correla con l'attività della malattia<sup>79</sup>.

La durata ottimale del trattamento immunosoppressivo non è conosciuta; la recidiva può insorgere in qualsiasi momento, anche in assenza di fattori scatenanti. Il rischio di recidiva è maggiore nei primi due anni di terapia e durante l'adolescenza, verosimilmente per un'inadeguata aderenza al trattamento. L'esperienza attuale suggerisce di prolungare il trattamento immunosoppressivo per almeno cinque anni dall'induzione della remissione prima di poter tentare una sospensione. Quest'ultima deve essere evitata durante la fase di sprut puberale, poiché in questo periodo il rischio di recidive è maggiore. In caso di trattamento convenzionale combinato si provvede a sospendere lo steroide verso il terzo-quarto anno di remissione e a mantenere l'azatioprina per un altro anno. È necessario, in questa fase, monitorare mensilmente transaminasi ed immunoglobuline per almeno tre mesi e successivamente ogni due mesi. Al raggiungimento del quinto anno dalla remissione, la dose di azatioprina viene ridotta di 25 mg ogni tre mesi, fino all'interruzione completa della terapia. Come a seguito della sospensione dello steroide, si ritorna al monitoraggio prima mensile e poi bimestrale delle transaminasi ed immunoglobuline.

Nel caso di una recidiva biochimica della malattia, caratterizzata da marcata citolisi, ipergammaglobulinemia ed elevato titolo autoanticorpale, si procede con il trattamento convenzionale oppure con un trattamento alternativo. A seconda della fase in cui si

presenta la recidiva, le modalità di ripresa del trattamento convenzione possono essere diverse. Nel caso in cui la recidiva si presenti in corso di sospensione dello steroide, quando è ancora in atto la terapia con azatioprina e la citolisi è moderata, l'approccio prevede la somministrazione di prednisone a giorni alterni, fino ad un dosaggio di 1 mg/Kg. In questo modo si riducono gli effetti avversi dello steroide, sebbene la risposta sia meno rapida. Nei casi di citolisi marcata e/o a seguito dell'interruzione della terapia con azatioprina, lo steroide dovrà essere ripreso ad alte dosi.

Una recidiva caratterizzata da moderata citolisi, senza aumento del titolo di immunoglobuline e di autoanticorpi, deve essere valutata con attenzione: occorre infatti escludere un'epatite infettiva intercorrente e successivamente valutare la necessità di una biopsia epatica di conferma.

Le terapia con steroidi espone il giovane paziente ad importanti effetti avversi. Sono frequenti l'iperfagia, l'aumento di peso e un rallentamento della crescita staturale. Le alte dosi necessarie ad affrontare l'esordio e la recidiva possono, inoltre, creare complicanze più gravi come obesità, grave ritardo di crescita, cataratta e riduzione del visus, osteoporosi e crolli vertebrali, iperglicemia, psicosi e gravi conseguenze estetiche legate al formarsi di strie cutanee cicatriziali. Queste complicanze sono più rare nei centri con maggiore esperienza nel trattamento delle epatopatie autoimmuni. È importante mantenere un adeguato controllo ponderale, poiché l'accumulo di grasso a livello viscerale aumenta l'afflusso di acidi grassi liberi verso il fegato, già "affaticato" dalla malattia di base.

Gli effetti avversi gravi attribuiti alla terapia con azatioprina sono rari, tuttavia in caso riscontro di linfopenia richiede la sospensione del trattamento. Non abbiamo dati sicuri circa la teratogenicità del farmaco nell'uomo, ma nell'adolescente in età fertile si preferisce escludere una gravidanza prima di intraprendere la terapia. Sebbene l'azatioprina non è risultata nociva per la salute né della madre né del bambino, si preferisce sostituirla con steroidi a basso dosaggio in caso di gravidanza<sup>80</sup>.

Un 10% circa di pazienti mostra scarsa o assente risposta alla terapia convenzionale ed alcuni rifiutano gli steroidi a causa degli effetti collaterali gravi: in questi casi esiste una chiara indicazione a trattamenti alternativi, ed in particolare, la ciclosporina ed il micofenolato mofetile.

La ciclosporina in monoterapia è efficace nell'indurre la remissione in pazienti con entrambi i tipi di epatite autoimmune. È un inibitore delle calcineurine ed agisce come

potente immunosoppressore riducendo la sintesi di interleuchina 2 e, di conseguenza, la proliferazione linfocitaria. In pediatria rappresenta l'alternativa più promettente alla terapia convenzionale, consentendo una risposta clinica e bioumorale in 6 mesi-1 anno. Gli effetti avversi nel breve-medio periodo sono rappresentati da un moderato e reversibile aumento della concentrazione sierica di creatinina, ipertrofia gengivale ed ipertricosi. Raramente si evidenziano ipertensione arteriosa ed insufficienza renale. Una volta ottenuta la remissione è possibile continuare con dosi di mantenimento di corticosteroidi o con la ciclosporina, assicurando una ciclosporinemia inferiore a 100 mg/Kg<sup>81,84</sup>.

Infine, il micofenolato mofetile è stato utilizzato con successo nei pazienti intolleranti alla azatioprina o resistenti alla terapia convenzionale. Si tratta di un pro-farmaco che viene metabolizzato a livello epatico e trasformato in acido micofenolico. Quest'ultimo, inibendo l'enzima inosina-monofosfato-deidrogenasi, compromette la sintesi delle purine e pertanto di nuove molecole di DNA, con conseguente azione antiproliferativa sui linfociti B e T attivati. Il trattamento prevede la somministrazione di micofenolato mofetile alla dose di 20-40 mg/Kg, in aggiunta ai corticosteroidi. Gli effetti avversi sono rappresentati da cefalea, diarrea, perdita di capelli e soprattutto leucopenia; occorre considerare attentamente il rischio di infezioni gravi.

### ***Il trapianto di fegato***

I pazienti trapiantati per epatite autoimmune rappresentano il 5% dei trapianti pediatrici, hanno una sopravvivenza a 5 anni, a seconda delle casistiche, dall' 86% al 94% e non presentano sostanziali differenze rispetto agli altri pazienti trapiantati di fegato in termini di sopravvivenza, complicanze e frequenza di ritrapianto<sup>82, 83</sup>.

Il trapianto di fegato, nei casi di epatite autoimmune, rappresenta un'opzione terapeutica in due circostanze. La prima è rappresentata dai casi ad esordio acuto grave o fulminante, che non rispondono alla "terapia di salvataggio" con tripla immunosoppressione. La seconda è data dall'insufficienza epatocellulare, che può svilupparsi nei pazienti con cirrosi.

Sebbene non siano stati identificati elementi predittivi per il trapianto, è evidente che l'incompleto controllo terapeutico favorisca l'insorgenza di una cirrosi post necrotica che, a sua volta, altera la funzione epatica al punto da richiedere una sostituzione d'organo. La

diagnosi precoce e l'appropriata terapia sono, in questo senso, fondamentali per prevenire la necessità di un trapianto di fegato.

Benché il trapianto di fegato sia un'efficace strategia terapeutica, nel 30% dei pazienti circa, si ha una recidiva della malattia epatica. La diagnosi di recidiva viene posta in presenza di aumento dei livelli di transaminasi, degli autoanticorpi e di IgG, riscontro di un'attività di interfaccia all'istologia e dipendenza dallo steroide. Le recidive sembrano essere più frequenti nei pazienti trapiantati per epatite autoimmune di tipo 2 e in coloro i quali avevano mostrato scarsa compliance alla terapia immunosoppressiva. Inoltre, è stato riportato che l'epatite autoimmune può anche insorgere *de novo* in seguito ad un trapianto epatico effettuato per malattie epatiche non autoimmuni. Questa complicanza del trapianto, prende il nome di *epatite autoimmune de novo* e presenta caratteristiche identiche a quelle della classica epatite autoimmune, cioè l'ipergammaglobulinemia, la positività per autoanticorpi ed l'attività di interfaccia. L'*epatite autoimmune de novo* non risponde in modo soddisfacente alle terapie anti-rigetto, ma risponde alla terapia convenzionale dell'epatite autoimmune.

### ***Terapie innovative***

Il riconoscimento del difetto numerico e funzionale dei linfociti T regolatori CD25+ (*Treg*), ha fatto sì che la ricerca si focalizzasse sulla possibilità di produrre linee cellulari autologhe capaci di interferire con i meccanismi di danno autoimmune. Sono stati così selezionati *Treg* attivi nei confronti dei verosimili antigeni trigger con l'idea di sopprimere il danno autoimmune senza l'ausilio di farmaci.

Nonostante la scarsa capacità di replicazione dei linfociti T CD25+, alcuni studi hanno provato a stimolarne la replicazione in vitro al fine di ripopolare il sistema immune periferico. Altri studi sono stati condotti con l'obiettivo di riprodurre i *Treg* a partire da linfociti T CD4+CD25- con risultati promettenti. Per il momento è stata dimostrata l'efficacia in vitro di cellule regolatrici specifiche per l'antigene CYP2D6 e la capacità di promuovere meccanismi di immunotolleranza attraverso il controllo della sintesi di citochine. Ciò suggerisce che attraverso l'infusione di *Treg* autologhi, precedentemente

stimolati, sia possibile ristabilire la tolleranza periferica nei pazienti con condizioni di autoimmunità<sup>84</sup>.

## ***1.2. Long-term outcome***

Il trattamento immunosoppressivo ha sostanzialmente modificato la prognosi della maggior parte dei pazienti con epatite autoimmune<sup>85-89</sup>. Infatti, secondo alcuni studi prognostici su soggetti adulti, il 40% dei pazienti con malattia severa non trattata andavano incontro a morte entro sei mesi dalla diagnosi e una cirrosi si sviluppava in almeno il 40% dei sopravvissuti nonostante la terapia immunosoppressiva<sup>90, 91</sup>.

D'altra parte il tasso di sopravvivenza a 10 anni tra gli adulti trattati è del 60% per quelli con cirrosi alla prima biopsia epatica e maggiore dell'80% per quei pazienti senza cirrosi alla diagnosi<sup>92</sup>. In letteratura, tuttavia, si riscontrano dati contrastanti sul ruolo della cirrosi nella storia naturale della malattia. In alcuni studi la cirrosi è significativamente associata ad una prognosi peggiore<sup>93</sup>, mentre altri descrivono un outcome sovrapponibile nei pazienti con e senza cirrosi all'esordio<sup>94, 95</sup>. In recente studio multicentrico giapponese<sup>95</sup> viene riportata una consistente associazione tra il numero di recidive di malattia e l'outcome a lungo termine dei pazienti con epatite autoimmune di tipo 1, suggerendo di prolungare la terapia a basse dosi soprattutto nei pazienti con più ricadute.

La prognosi a lungo termine dell'epatite autoimmune diagnosticata in età pediatrica rimane invece ancora poca conosciuta. Nei cinque principali studi pubblicati sull'outcome a lungo termine di bambini con epatite autoimmune (*tabella 6*) il follow-up riportato varia dai 4,8 ai 10 anni e da questi studi emerge che il tasso di sopravvivenza globale in pazienti in terapia immunosoppressiva prolungata supera l'80%. Nello studio di Feldestein et al., tuttavia, la sopravvivenza nei bambini con epatite autoimmune è risultata essere significativamente inferiore rispetto a quella di individui sani dello stesso sesso ed età. La sopravvivenza a 5 e 10 anni con il fegato nativo variava, nei diversi studi, tra il 66% e il 58% rispettivamente<sup>2, 3, 93, 96, 97</sup>.

La presenza di cirrosi alla prima biopsia epatica non sembra avere un impatto sulla sopravvivenza a lungo termine di questi pazienti<sup>93</sup>, mentre bilirubina e INR al momento della diagnosi sono risultati essere fattori di rischio indipendenti di morte e/o di trapianto<sup>2, 96</sup>. Il trattamento immunosoppressivo necessita di essere prolungato a lungo termine nella maggior parte dei soggetti affetti, tuttavia una remissione sostenuta dopo la sospensione della terapia è stata riportata nel 13-20% dei pazienti<sup>3, 93, 96</sup>.

La progressione ad una insufficienza epatica terminale che conduce al trapianto di fegato è stata riportata da 8 a 14 anni dopo la diagnosi in 8-16% dei bambini con epatite autoimmune in trattamento immunosoppressivo, nonostante l'assenza di una evidente ricaduta biochimica<sup>3, 95, 96</sup>.



**Tabella 6.** Long-term outcome dei pazienti affetti da EAI: principali studi retrospettivi nella popolazione pediatrica.

<i>Autore</i>	<i>Popolazione</i>	<i>Età mediana all'esordio (anni)</i>	<i>Durata mediana del follow-up (anni)</i>	<i>Remissione persistente senza terapia al termine del follow-up</i>	<i>Trapiantati al termine del follow-up</i>	<i>Mortalità al termine del follow-up</i>	<i>Sopravvivenza globale al termine del follow-up</i>	<i>Sopravvivenza con fegato nativo al termine del follow-up</i>
<i>Maggiore et al. 1993</i>	N=31	9* (2-14,5)	4,8*	13%	16%	6%	87%	71%
<i>Gregorio et al. 1997</i>	N= 52	10 (2-15)	5 (0,3-19)	31%	10%	12%	88%	79%
<i>Saadah et al. 2001</i>	N=30†	10* (4-14,4)	10* (0,5-23)	20%	3%	6%‡	83%	80%
<i>Radhakrishnan et al. 2010</i>	N=33	12,9 (2,7-18,1)	6,1 (0,9-28,7)	6%	26%	18%	82%	73%
<i>Deneau et al. 2014</i>	N=56♦	11,1 (5,7-14,4)	5,6 (2,6-8,6)	25%	5%	0%	100%	94%

\*Media;

†21 EAI, 4 APECED, 1 epatite gigantomacellulare associata ad anemia emolitica autoimmune (GCH-AHA), 4 epatiti sieronegative;

♦ 44 EAI e colangite sclerosante autoimmune, 12 colangite sclerosante primitiva (PSC)

‡ Valore riferito esclusivamente ai casi di EAI

## *Capitolo 2*

### *2.0. Scopo dello studio*

Scopo di questo studio è stato di raccogliere ed analizzare i dati dei pazienti affetti da epatite autoimmune di tipo 1 e di tipo 2 afferenti all'U.O. di Epatologia e Gastroenterologia Pediatrica di Pisa, con follow-up di almeno 5 anni, per valutarne l'evoluzione a lungo termine.

Le finalità specifiche dello studio sono di analizzare le differenze tra i due tipi di epatite autoimmune attraverso la descrizione delle caratteristiche cliniche e biochimiche all'esordio e durante il corso del follow-up; di valutare l'efficacia a lungo termine della terapia immunosoppressiva considerando il numero di recidive e la durata della remissione della malattia; ed infine di esaminare la presenza di fattori predittivi di outcome a lungo termine di questa rara e severa patologia.

## 2.1. Pazienti e metodi

Al fine di valutare l'outcome a lungo termine dei bambini affetti da epatite autoimmune di tipo 1 e di tipo 2, è stato disegnato uno studio retrospettivo monocentrico che analizza i dati dei pazienti afferenti all'U.O. di Epatologia e Gastroenterologia Pediatrica di Pisa.

I criteri di inclusione allo studio sono rappresentati dalla diagnosi di epatite autoimmune di tipo 1 o 2 in età pediatrica in pazienti con un follow-up minimo di 5 anni.

Sono stati esclusi i casi di epatite infettiva (HAV, HBV, HCV, EBV, CMV, HSV), *epatite associata a malattia celiaca*, deficit di  $\alpha$ 1-antitripsina e malattia di Wilson; inoltre, sono stati esclusi i pazienti affetti da colangite sclerosante autoimmune, da sindrome da overlap e da epatite autoimmune sieronegativa.

La ricerca degli autoanticorpi suggestivi di epatite autoimmune è stata effettuata attraverso la tecnica di immunofluorescenza indiretta. In tutti i bambini, ad eccezione di 2 che presentavano una marcata anomalia dell'emostasi, è stata eseguita una biopsia; l'attività necroticoinfiammatoria (*grading*) e lo stato di fibrosi (*staging*) sono stati descritti utilizzando lo score di Ishak e alle lesioni delle vie biliari è stato attribuito un punteggio crescente a seconda della severità. La coorte selezionata è costituita da 23 pazienti (18 femmine e 5 maschi) con diagnosi di epatite autoimmune effettuata in età pediatrica. Dei pazienti arruolati, 10 sono affetti da epatite autoimmune di tipo 1 (EAI-1) (6 femmine e 4 maschi) e 13 da un'epatite autoimmune di tipo 2 (EAI-2) (12 femmine e 1 maschio). Le caratteristiche cliniche e di laboratorio all'esordio di tutti i pazienti sono riportate nella *tabella 1*. Alla diagnosi tutti i pazienti hanno intrapreso una terapia immunosoppressiva con due principali obiettivi: la normalizzazione della funzione epatocellulare, testimoniata dalla presenza di un'attività protrombinica normale, ed il raggiungimento e, successivamente, il mantenimento di una condizione stabile di remissione. Quest'ultima condizione di **remissione** è stata definita come una risoluzione completa del quadro clinico (remissione clinica) associata a livelli normali di aminotransferasi e IgG, e alla negatività o alla presenza di autoanticorpi a titolo molto basso (remissione bioumorale). Un nuovo incremento delle transaminasi associato o meno alla comparsa di segni e/o sintomi suggestivi di disfunzione epatica in corso o alla sospensione della terapia immunosoppressiva è stata definita come **recidiva** (bioumorale e/o clinica).

Al termine del follow-up mediano di 12,7 anni (range 5,8-24,1 anni) è stata valutata l'efficacia e la sicurezza della terapia immunosoppressiva nell'indurre e mantenere la remissione clinica e bioumorale, il rischio di recidiva, la possibilità di sospensione del trattamento e lo sviluppo di complicanze. È stata inoltre valutata la presenza di eventuali fattori predittivi di outcome a lungo termine dell'epatite autoimmune laddove abbiamo definito outcome positivo come una remissione clinica e bioumorale persistente da almeno 3 anni in pazienti monoterapia.

### ***Caratteristiche cliniche***

L'età mediana alla diagnosi dei nostri 23 pazienti era di 7,1 anni (range 1,3-14,8 anni); in particolare, di 9 anni in quelli con EAI-1 (range 2,4-14,8 anni) e di 5,6 anni nei pazienti con EAI-2 (range 1,3-14,2 anni).

Nove pazienti su 23 (39%) (3 EAI-1 e 6 EAI-2) presentavano familiarità per malattie autoimmuni nei parenti di primo grado. Ricorrono più di frequente le tireopatie autoimmuni e la psoriasi (in 4 e 3 casi, rispettivamente), ma si riscontrano anche casi di artrite reumatoide, retto-colite ulcerosa, lupus eritematoso sistemico, sclerosi multipla, sindrome da anticorpi anti fosfolipidi, porpora trombocitopenica immunomediata, gastrite autoimmune, cheratocono immunomediato ed ipoacusia bilaterale immunomediata.

La malattia ha esordito acutamente in 13 casi (8 EAI-1 e 5 EAI-2). In particolare, 8 pazienti (6 EAI-1 e 2 EAI-2) hanno presentato un'epatite acuta simil virale con astenia, ittero, feci acoliche ed urine ipercromiche; in tutti si è riscontrata epatomegalia e in 4 casi anche splenomegalia. Nei restanti 4 (2 EAI-1 e 2 EAI-2) dei 13 pazienti ad esordio acuto, la malattia si è manifestata come insufficienza epatica acuta caratterizzata clinicamente da epatomegalia, ittero (2 casi) e splenomegalia (1 caso). Infine, in una sola paziente affetta da EAI-2 è stato riportato un quadro clinico di insufficienza epatica acuta su cronica; la paziente ha esordito con ittero, epatomegalia dura, marcata splenomegalia e con valori sierici di transaminasi superiori di 40 volte il limite normale.

In 10 pazienti (2 EAI-1, 8 EAI-2) il sospetto diagnostico è insorto dopo il riscontro occasionale di un incremento persistente delle transaminasi. Nonostante l'esordio asintomatico della malattia, in 4 pazienti si è evidenziata epatomegalia ed in uno epatosplenomegalia; gli altri 5 non avevano alcun segno clinico suggestivo di epatopatia.

Inoltre, in una delle pazienti con EAI-1 la malattia ha seguito di 16 giorni l'inizio di una terapia con aminoclorina. In due delle pazienti con esordio acuto sono state diagnosticate contestualmente alla EAI-2 una patologia autoimmune/immunomediata extra epatica, rispettivamente un'artrite, una tiroidite autoimmune.

Il tempo mediano intercorso tra l'esordio della malattia e la diagnosi è stato di 2 settimane (range 0-52 settimane dall'esordio); il ritardo diagnostico è stato maggiore nei casi paucisintomatici (mediana 16 settimane).

### ***Caratteristiche di laboratorio***

Dei 10 pazienti affetti da EAI-1, 4 erano ANA/SMA positivi, 3 ANA positivi e 3 SMA positivi. Nove dei casi di EAI-2 presentavano positività per LKM, una paziente era solo LC-1 positiva e 3 erano positivi sia per LKM che per LC-1. Tra questi ultimi una paziente presentava anche una positività per gli ANA a titolo significativo (1:160).

Gli esami ematici all'esordio erano caratterizzati da un'attività sierica mediana dell'enzima aspartato amino-transferasi (AST) di 15,5 volte il limite superiore della norma (10,6 x N EAI-1; 14,5 x N EAI-2; range 4-55 x N) e da un'attività sierica mediana dell'enzima alanina amino-transferasi (ALT) di 18 volte il limite superiore della norma (17,3 x N EAI-1; 20 x N EAI-2; range 6-73 x N). Le gamma glutammil-transferasi ( $\gamma$ GT) erano elevate in 7 pazienti: 5 con EAI-1, nei quali i valori mediani superavano di 2 volte limite superiore della norma; due affette da EAI-2 con un valore di 1,3 e 2,5 volte il normale.

In 21 dei 23 pazienti è stato riscontrato un titolo di IgG al di sopra dei valori medi ed in particolare in 9 pazienti (6 EAI-1, 3 EAI-2), 8 dei quali con epatite ad esordio acuto, è stato riscontrato un titolo di IgG sopra 2 deviazioni standard rispetto al range normale per età. Due pazienti affetti da EAI-2 non presentavano un'ipergammaglobulinemia. Un paziente con EAI-1 presentava inoltre un deficit parziale di IgA.

Tra i pazienti con epatite acuta la bilirubina aveva un valore mediano di 3,88 mg/dl (range 1,79-11,7 mg/dl). Una riduzione della funzione di sintesi epatica, descritta da un valore di PT inferiore al 50%, è stata riscontrata in 5 pazienti (2 EAI-1 e 3 EAI-2), mentre i valori mediani albumina erano di 4,35 g/dl (range 3,8-4,8 g/dl) (*tabella 1*).

### ***Caratteristiche istologiche***

La biopsia è stata condotta in tutti i pazienti esclusi 2 in cui non è stato possibile a causa di disturbi dell'emostasi. La stadiazione è stata effettuata in accordo con lo score di Ishak in tutti i pazienti ad eccezione di 2 in cui la biopsia è stata effettuata in altro centro. I valori mediani dell'attività necrotico-infiammatoria e del grado di fibrosi erano rispettivamente 9/18 (9/18 per EAI-1 e 8/18 per EAI-2; range 6-16/18) ed 1/6 ( 1/6 per EAI-1 e 1/6 per EAI-2; range 1-5/6). Il reperto istologico di cirrosi è stato evidenziato in una sola paziente. Si tratta dell'unico caso di EAI-2 che ha esordito con le caratteristiche di un'insufficienza epatica acuta su cronica (*tabella 2*).

La diagnosi di epatite autoimmune è stata effettuata in accordo con *l'International Autoimmune Hepatitis Group criteria and scoring system* e corrispondeva in tutti i pazienti ad una diagnosi di epatite autoimmune certa (range di valori compresi tra 17 e 27)

### ***Trattamento iniziale***

Alla diagnosi, 10 pazienti (3 con EAI-1 e 7 con EAI-2) hanno intrapreso una terapia convenzionale con prednisone alla dose di 2 mg/Kg/die (fino ad un massimo di 60 mg/die) ed azatioprina alla dose di 1,5-2 mg/Kg/die; in 5 casi (2 EAI-1 e 3 EAI-2) è stato somministrato prednisone in monoterapia.

Otto pazienti (3 con EAI-1 e 5 con EAI-2) hanno ricevuto una terapia di prima linea con ciclosporina alla dose iniziale di 1 mg/Kg/die con una ciclosporinemia bersaglio di  $200 \pm 50$  ng/mL. Le indicazioni all'utilizzo della ciclosporina come terapia di prima linea sono state: severità della malattia all'esordio, rifiuto dello steroide da parte di una paziente, età inferiore ai 3 anni, eccesso ponderale, candidiasi cutanea.

**Tabella 1.** Caratteristiche cliniche e bioumorali all'esordio dei 23 pazienti con EAI.

Pz	EAI	Età (aa)	Sesso	Esordio	ALT (x N)	IgG (mg/dl)	PT %	GGT (x N)	AutoAb
1	1	2,4	M	asintomatico	7	nd	nd	N	SMA <sup>+</sup>
2	1	6,4	M	epatite acuta	12	7000	nd	N	SMA <sup>+</sup>
3	1	7,5	F	epatite acuta	40	nd	64	2	ANA <sup>+</sup> SMA <sup>+</sup>
4	1	10	M	insufficienza epatica acuta	24	4430	43	nd	ANA <sup>+</sup> SMA <sup>+</sup>
5	1	10,4	F	epatite acuta	15,7	1934	98	1,42	ANA <sup>+</sup>
6	1	10,7	F	epatite acuta	25	nd	90	nd	ANA <sup>+</sup> SMA <sup>+</sup>
7	1	11,5	F	epatite acuta	16,7	6418	61	3	ANA <sup>+</sup> SMA <sup>+</sup>
8	1	12,1	M	epatite acuta	Nd	nd	nd	nd	SMA <sup>+</sup>
9	1	12,9	F	insufficienza epatica acuta	6,5	3911	43	2,1	SMA <sup>+</sup>
10	1	14,8	F	epatite acuta	18	5575	65	1,8	ANA <sup>+</sup>
11	2	1,3	F	asintomatico	12	1260	90	N	LKM-1 <sup>+</sup> LC-1 <sup>+</sup>
12	2	1,4	F	asintomatico	20	813	nd	N	LKM-1 <sup>+</sup>
13	2	2,2	F	epatite acuta	73	1620	80	N	LKM-1 <sup>+</sup>
14	2	2,4	F	epatite acuta	20	2000	49	N	LKM-1 <sup>+</sup>
15	2	2,7	F	asintomatico	25	1218	91	N	LKM-1 <sup>+</sup>
16	2	3,9	F	asintomatico	13	1600	90	N	LKM-1 <sup>+</sup>
17	2	4,7	F	asintomatico	27	1533	56	1,3	LKM-1 <sup>+</sup>
18	2	5,9	M	asintomatico	7	1800	84	N	LKM-1 <sup>+</sup>
19	2	6,3	F	asintomatico	6	1240	85	N	LKM-1 <sup>+</sup>
20	2	9,0	F	epatite acuta	30	2540	45	N	LC-1 <sup>+</sup>
21	2	10,9	F	asintomatico	6	nd	55	N	LKM-1 <sup>+</sup> LC-1 <sup>+</sup>
22	2	13,2	F	insufficienza epatica acuta	42	1200	34	2,5	LKM-1 <sup>+</sup>
23	2	14,2	F	epatite acuta	20	2000	75	N	LKM-1 <sup>+</sup>

\* nd: non disponibile

**Tabella 2.** Caratteristiche istologiche all'esordio dei 23 pazienti con EAI.

Pz	EAI	Grading (score di Ishak)	Staging (score di Ishak)	Lesioni biliari*
1	1	12/18	1/6	0
2	1	nd‡	nd‡	nd‡
3	1	9/18	2/6	0
4	1	Non eseguita†	Non eseguita†	Non eseguita†
5	1	12/18	0/6	0
6	1	9/18	2/6	0
7	1	9/18	1/6	0
8	1	nd‡	nd‡	nd‡
9	1	Non eseguita†	Non eseguita†	Non eseguita†
10	1	9/18	2/6	0
11	2	6/18	1/6	0
12	2	4/18	1/6	0
13	2	6/18	1/6	0
14	2	12/18	1/6	0
15	2	8/18	2/6	0
16	2	10/18	1/6	0
17	2	13/18	1/6	0
18	2	8/18	2/6	0
19	2	8/18	1/6	0
20	2	10/18	1/6	0
21	2	12/18	4/6	0
22	2	12/18	5/6	0
23	2	16/18	1/6	0

\* Lesioni biliari: 0 assenti, 1 lievi, 2 moderate, 3 severe.

‡ Non disponibile

† Biopsia non eseguita per difetto dell'emostasi.



## ***2.2. Analisi statistica***

Tutti i dati sono stati espressi come mediana e range. Le variabili ordinali e categoriali sono state paragonate attraverso il test del  $\chi^2$  e le variabili continue attraverso il test t di Student. La regressione lineare *per passi* è stata applicata nella valutazione del ruolo predittivo di alcune variabili sull'outcome e sulla recidiva di malattia; per i risultati statisticamente significativi è stata applicata una regressione logistica multivariata, al fine di aumentare la potenza statistica dei dati. L'analisi di Kaplan Maier è stata utilizzata per indagare la probabilità di una recidiva di malattia a 5 anni dall'inizio della terapia. Un valore di probalibilita ( $p$ ) inferiore a 0,05 è stato considerato come significativo.

Tutte le valutazioni statistiche sono state eseguite mediante programma SPSS-versione 13.0 (Statistical Package of Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## 2.3. Risultati

### *Caratteristiche all'esordio*

I bambini affetti da EAI-2 hanno un'età significativamente inferiore rispetto a quelli con EAI-1 ( $p < 0,03$ ). Si osserva inoltre, in entrambi i tipi di epatite, una maggiore prevalenza della malattia nelle femmine piuttosto che nei maschi ( $p = 0,06$ ). Non vi è una differenza statisticamente significativa nella familiarità per malattie autoimmuni nei due tipi di epatite anche se nella nostra coorte è più frequente nei pazienti affetti da EAI-2 (*grafici 1 e 2*).

Nei pazienti con EAI-1 la malattia si è presentata acutamente con una frequenza significativamente maggiore rispetto ai pazienti con EAI-2 ( $p < 0,05$ ). Nel 80% dei casi di EAI-1, infatti, l'esordio è stato acuto (60% epatite acuta simil virale, 20% con insufficienza epatica acuta); nel restante 20% l'esordio è stato asintomatico ed il sospetto diagnostico è insorto dopo il riscontro occasionale di un incremento persistente delle transaminasi. I pazienti con EAI-2 hanno, dall'altra parte, presentato un esordio acuto nel 31% dei casi (15% epatite acuta simil virale, 23% un'insufficienza epatica) ed asintomatico nel 62% dei casi.

I valori mediani di AST, ALT, bilirubina e il PT all'esordio della malattia non differiscono in maniera statisticamente significativa tra i due tipi di epatite. Nei casi EAI-1 è, invece, presente un aumento significativo dei livelli sierici di  $\gamma$ GT ( $p < 0,01$ ) ed un più frequente, seppur non raggiungendo la significatività statistica, un incremento delle IgG sopra il limite normale per età ( $p = 0,07$ ).

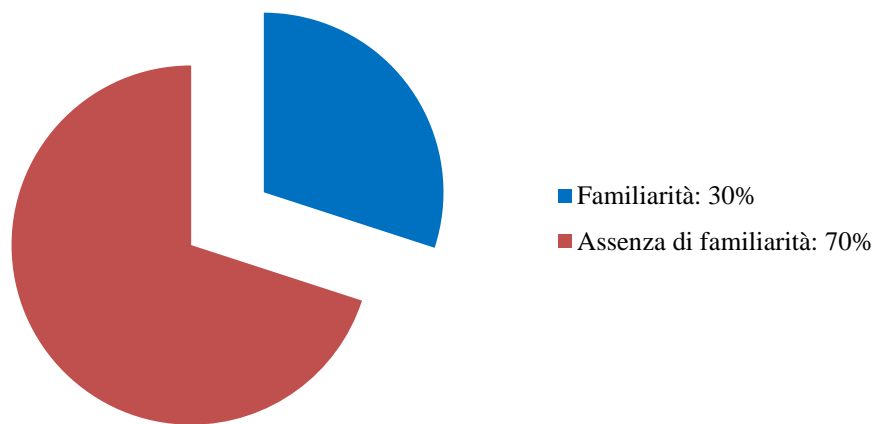
I valori mediani di *grading e staging* attribuiti ai campioni bioptici dei due gruppi sono sovrapponibili e non indicano la presenza differenze statisticamente significative nel grado di attività necrotico-infiammatoria e di fibrosi all'esordio (*tabella 3*).

**Tabella 3.** Caratteristiche cliniche e di laboratorio all'esordio del gruppo di pazienti con EAI-1 e EAI-2 e significatività statistica.

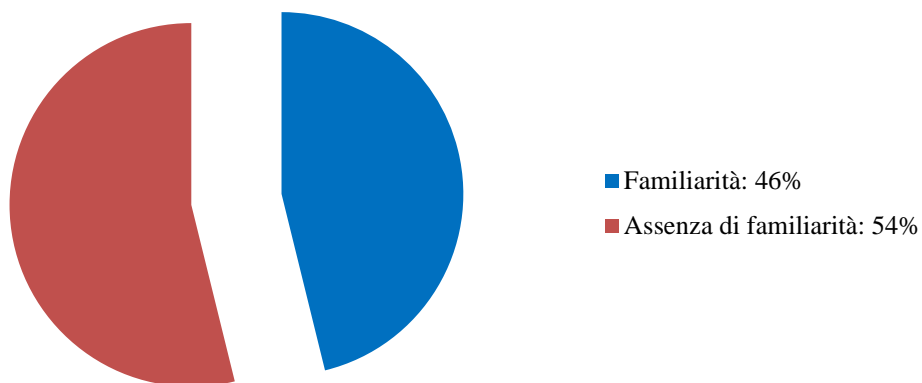
	EAI-1	EAI-2	p-value
<b>Età (anni), mediana (range)</b>	9 (2,4- 14,8)	5,6 (1,3-14,2)	<0,03
<b>Sesso femminile, (%) n</b>	60% (6/10)	92,3% (12/13)	NS (0,06)
<b>Esordio acuto</b>	80% (8/10)	30% (5/13)	<0,05
epatite acuta	60% (6/10)	15% (2/13)	<0,03
insufficienze epatica acuta	20% (2/10)	23% (3/13)	NS
<b>Esordio asintomatico</b>	20% (2/10)	62% (8/13)	<0,05
<b>AST, (x N) (v.n. ≤ 40 UI/L)</b>	10,6 (6-34,7)	14,5 (4-55)	NS (0,07)
<b>ALT, (x N) (v.n. ≤ 40 UI/L)</b>	17,3 (6,5-40)	20(6-73)	NS
<b>GGT, (%) n (v.n. ≤ 38 UI/L)</b>	60% (6/10)	7,7% (1/13)	<0,01
<b>IgG &gt; 2DS, (%) n</b>	60% (6/10)	23% (3/13)	NS (0,07)
<b>PT &lt; 50%, (%) n</b>	20% (2/10)	23% (3/13)	NS
<b>Bilirubina &gt; 1,2 mg/dl, (%) n</b>	30% (3/10)	38,5% (5/13)	NS
<b>Istologia, mediana (range)</b>			
Grading	9/18 (4-16/18)	8/18 (9-12/18)	NS
Staging	1/6 (0-2/6)	1/6 (1-5/6)	NS
<b>Familiarità per patologie autoimmuni, (%) n</b>	30% (3/10)	46% (6/13)	NS
<b>Patologie autoimmuni associate, (%) n</b>	30% (3/10)	31% (4/13)	NS

NS = non significativo.

**Grafico 1.** Familiarità per malattie autoimmuni in pazienti affetti da EAI-1



**Grafico 2.** Familiarità per malattie autoimmuni in pazienti affetti da EAI-2



### ***Prima remissione***

La remissione clinica e bioumorale è stata raggiunta, in tutti i pazienti, in un tempo mediano di 8 settimane dalla diagnosi senza differenza statisticamente significativa tra i due tipi di epatite (6 settimane nell'EAI-1 ed 8 settimane nell'EAI-2; range 4-35,9 settimane). Non è stata, inoltre, riscontrata una differenza statisticamente significativa

nell'efficacia e nel tempo necessario ad indurre la remissione clinica e bioumorale nel gruppo di pazienti in terapia convenzionale e nel gruppo in terapia con ciclosporina.

Dopo aver ottenuto la prima remissione clinica e bioumorale della malattia con la persistente normalizzazione dei livelli di transaminasi e degli indici di funzionalità epatica la terapia è stata modificata in modo tale da mantenere la remissione con il più basso livello di immunosoppressore possibile.

### ***Outcome***

Nei 23 pazienti arruolati è stata seguita l'evoluzione della malattia per un periodo mediano di 12,7 anni (range 5,8-24,1 anni). Il 30% dei pazienti è stato seguito per più di 20 anni, il 26% per un periodo tra i 10 e 20 anni ed il restante 44% per un periodo compreso tra i 5 e 10 anni.

#### **Remissione clinica e bioumorale persistente in corso di terapia immunosoppressiva.**

In 7 dei 23 pazienti (30%; 3 EAI-1 e 4 EAI-2) la terapia immunosoppressiva ha determinato una remissione clinica a bioumorale prolungata ed, infatti, la malattia non ha mai recidivato durante il trattamento immunosoppressivo. In questi casi l'età mediana alla diagnosi era di 2,7 anni (EAI-1 10,3 e EAI-2 2,5; range 1,3-11,5 anni). I pazienti hanno raggiunto la remissione dopo un periodo mediano di 4 settimane (range 3,9-9,3 settimane) e la terapia, ancora in corso, si prolunga da un tempo mediano di 7,7 anni (range 5,8-14,6 anni).

**Recidive cliniche e bioumorali in corso di terapia immunosoppressiva.** Durante l'intero periodo di trattamento 16 dei 23 pazienti (70%; 7 EAI-1 e 9 EAI-2) hanno presentato una o più recidive di malattia. In questi casi l'età mediana alla diagnosi era di 9 anni (EAI-1 10,5 e EAI-2 5,3; range 1,4-14,8 anni). I pazienti hanno raggiunto la remissione dopo un periodo mediano di 8 settimane (range 4,3-35,9 settimane). Per ogni paziente il numero mediano di recidive calcolato è stato pari a 2 (EAI-1 2,5 e EAI-2 2; range 1-6 recidive): la prima recidiva si è verificata dopo un periodo mediano di 6 anni dall'inizio della terapia immunosoppressiva (6 EAI-1 e 6,4 EAI-2; range 0,08-13,6 anni) all'età mediana di 14,8

anni (14,8 EAI-1 e 14,9 EAI-2; range 3,8-24,4 anni); la seconda recidiva è stata invece riscontrata dopo un periodo mediano dall'inizio della terapia di 7 anni (5,6 EAI-1 e 14,1 EAI-2; range 1,6-22 anni) all'età mediana di 15,2 anni (14,4 EAI-1 e 16,4 EAI-2; range 9,4-33,7 anni) dopo un anno dalla prima. Otto di questi pazienti erano, al momento della recidiva, in terapia con prednisone e azatioprina, 2 con solo prednisone e 6 con ciclosporina. Nel 31% dei casi le recidive sono risultate correlate ad una scarsa aderenza al trattamento immunosoppressivo. Sette dei pazienti in terapia convenzionale hanno raggiunto nuovamente un stato di remissione clinica e bioumorale aumentando la dose di prednisone o di azatioprina; in un caso, invece, è stata necessaria l'introduzione di una terapia immunosoppressiva alternativa (ciclosporina, micofenolato mofetile, tacrolimus). Anche i pazienti in trattamento con prednisone hanno rapidamente raggiunto la remissione aumentando i dosaggi di prednisone ed in un solo caso è stata introdotta, in aggiunta, la ciclosporina. Infine, nei pazienti in trattamento con ciclosporina la remissione è stata nuovamente ottenuta attraverso l'adeguamento della terapia e l'introduzione del prednisone in 1 caso.

In 4 pazienti, in particolare 3 EAI-1 ed 1 EAI-2, la malattia è stata caratterizzata da una persistente attività citolitica, con scarso successo nel mantenimento della remissione. In questi pazienti, infatti, seguiti per un periodo mediano di 11,5 anni (range 8,6-23,1 anni), la malattia ha recidivato un numero mediano di volte pari a 5 (range 3-6) rendendo necessaria una terapia di salvataggio. L'associazione di prednisone, ciclosporina ed azatioprina ha permesso di raggiungere la remissione in tutti e 3 i casi di EAI-1. Nella paziente affetta da EAI-2 sono stati invece introdotti ciclosporina, azatioprina e micofenolato, successivamente sostituiti da tacrolimus e micofenolato. La scelta di una più consistente immunosoppressione è stata motivata non solo dalla costante attività dell'epatite, ma anche dalla associazione di più patologie autoimmuni nella stessa paziente. Nonostante la triplice terapia immunosoppressiva, tuttavia, il controllo della malattia è stato scarso con la progressione del danno epatico.

Il follow-up di questi ultimi tre pazienti con EAI-1 ha evidenziato, inoltre, una persistente elevazione dei titoli di IgG non solo durante le fasi di recidiva della malattia, ma anche nei periodi di remissione. Questo *pattern* non è stato, invece, riscontrato nel paziente affetto da EAI-2.

Tra i 16 pazienti in cui la malattia ha recidivato, 7 (44%) presentavano patologie autoimmuni extraepatiche associate ( $p<0,03$ ). Inoltre, in questo sottogruppo di pazienti, il numero di recidive risultava maggiore rispetto ai pazienti senza tale comorbidità.

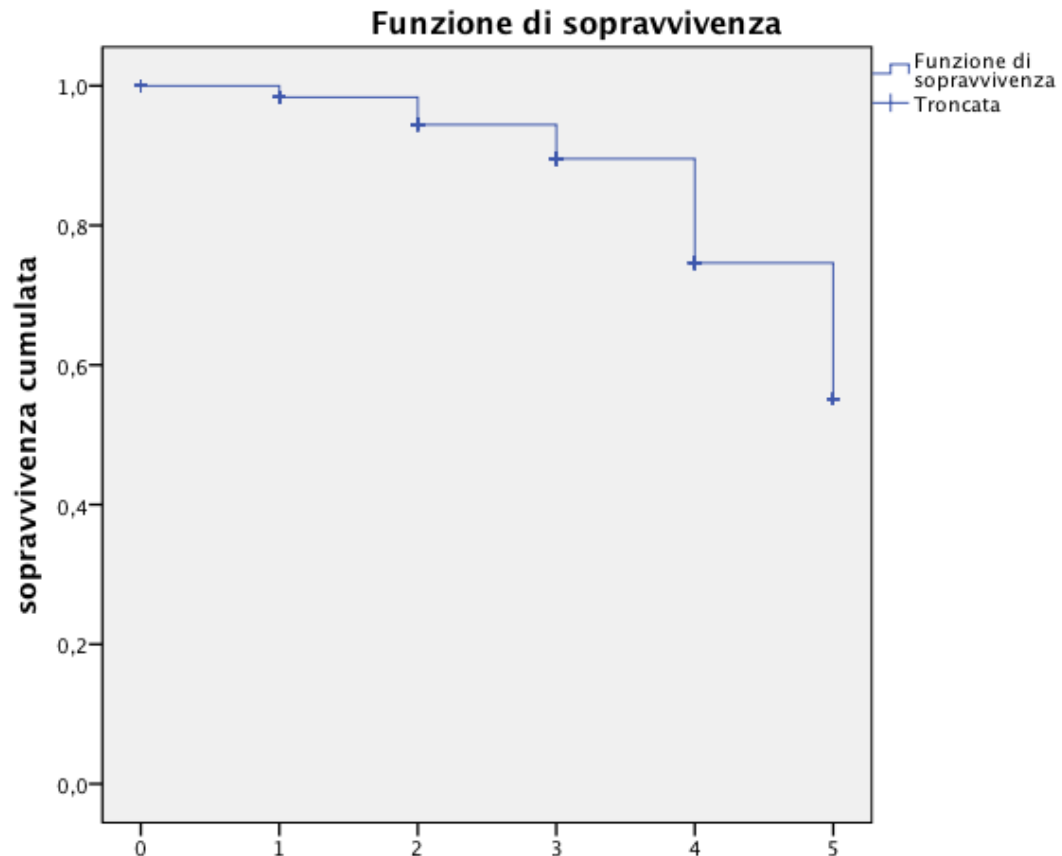
Una regressione lineare *per passi* è stata condotta per valutare il ruolo di predittori di recidiva di alcuni parametri all'esordio. In quest'analisi sono stati valutati: età all'esordio (maggiore vs minore di 4 anni), sesso, tipo di epatite, modalità di esordio clinico della malattia (acuto vs asintomatico), tipo di terapia (prednisone/azatioprina o prednisone vs ciclosporina), indici biochimici (ipertransaminasemia moderata vs severa,  $\gamma$ GT maggiori vs minori di N, IgG maggiori vs inferiori di 2DS, PT maggiore vs minore del 50%, albumina maggiore vs minore di 3,6 mg/dl), familiarità per malattie autoimmuni, compliance alla terapia ed tempo necessario per raggiungere la prima remissione (maggiore di 8 settimane vs minore di 8 settimane). La regressione ha individuato che il valore di PT all'esordio è statisticamente correlato con le recidive di malattia (*tabella 4*). La regressione logistica multivariata non ha tuttavia raggiunto la significatività statistica per questo parametro.

Infine, attraverso il metodo di Kaplan-Meier abbiamo analizzato la probabilità a 5 anni di presentare recidive di malattia che è risultata del 45% (*grafico 3*).

**Tabella 4.** Predittori di recidiva: risultati della regressione lineare per passi.

<i>Predittori</i>	<i>p-value</i>
<i>Tipo di EAI, (EAI-1 vs EAI-2)</i>	NS
<i>Esordio, (acuto vs asintomatico)</i>	NS
<i>ALT, ( 2-10 x N vs &gt;10 x N)</i>	NS
<i><math>\gamma</math>GT, (&gt;N vs N)</i>	NS
<i>PT, (&gt;50% vs &lt;50%)</i>	<0,01

**Grafico 3.** *Analisi di Kaplan-Meier: probabilità di recidiva di malattia a 5 anni dall'inizio della terapia.*



**Tentativi di sospensione del trattamento immunosoppressivo.** Sette pazienti (30%) di cui 6 dei pazienti in terapia convenzionale ed 1 in monoterapia con prednisone (4 EAI-1 e 3 EAI-2) hanno tentativamente sospeso il trattamento immunosoppressivo dopo un periodo mediano di 12 anni di terapia (range 7,8-22,3 anni). Eccetto un caso di EAI-1 in persistente remissione, in tutti gli altri la malattia è recidivata dopo un tempo mediano di 12,8 anni (range 7,9-22 anni) dall'inizio del trattamento e dopo 0,5 anni (range 1 mese-1,9 anni) dalla sua sospensione. È stata pertanto introdotta una terapia alternativa con ciclosporina in 3 pazienti e nuovamente iniziata la terapia convenzionale nei restanti 2. La remissione è stata ottenuta, in tutti i pazienti, dopo un periodo mediano di 4 settimane



(range 4-8 settimane). In una paziente, dopo ulteriori 2,5 anni di terapia con ciclosporina è stata nuovamente tentata la sospensione del trattamento immunosoppressivo con il mantenimento della remissione clinica e bioumorale.

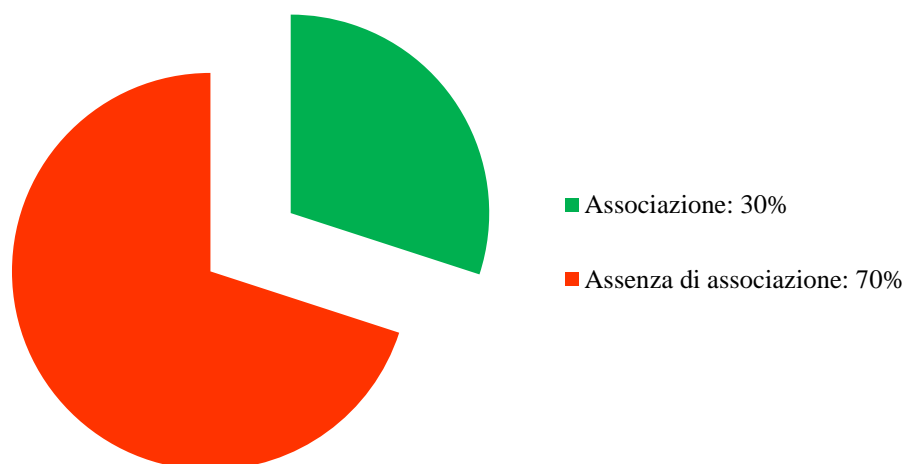
### ***Comorbidità***

In 7 pazienti (30%; 3 EAI-1, 4 EAI-2) sono state diagnosticate precedentemente, contestualmente o successivamente alla diagnosi di epatite autoimmune, patologie autoimmuni o comunque immunomEDIATE extraepatiche. In 3 dei pazienti con EAI-1 sono state riscontrate, rispettivamente, piastrinopenia immunomediata, tiroidite autoimmune e lupus eritematoso sistemico (*grafico 4*). Per quanto riguarda i 4 pazienti con EAI-2: a due pazienti è stata diagnosticata una tiroidite autoimmune, ad una paziente sindrome da anticorpi anti fosfolipidi, entesite psoriasica, psoriasi guttata, vasculite ed entesite autoimmuni e tiroidite autoimmune. Infine, in una bambina è stata diagnosticata la sindrome polighiandolare autoimmune di tipo 1 (APECED). In quest'ultima paziente è stato riscontrato un ipoparatiroidismo all'età di 3 anni e successivamente è stata fatta diagnosi di candidiasi cutanea, epatite autoimmune e displasia dello smalto dentario (*grafico 5*).

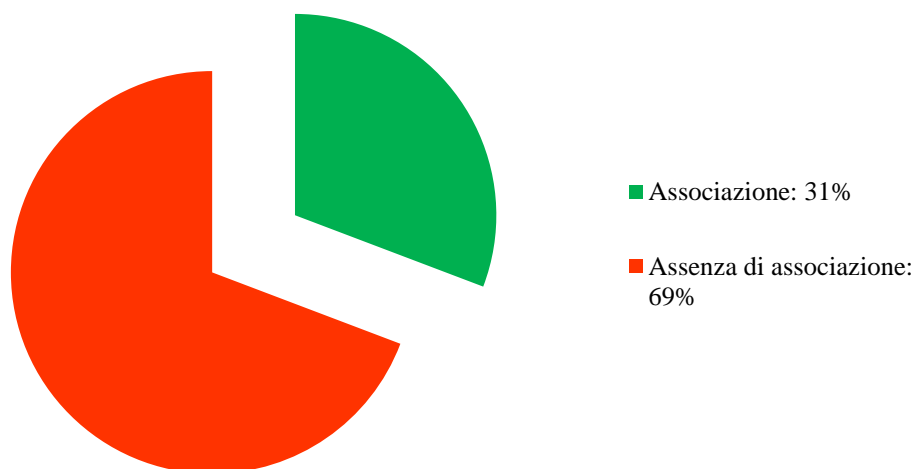
Non si evidenzia una differenza statisticamente significativa nell'associazione a patologie autoimmuni extraepatiche tra i pazienti affetti da EAI-1 ed EAI-2.

In 4 pazienti, inoltre, è stata riscontrata, successivamente alla diagnosi di EAI, un rallentamento della crescita staturale. In 2 di questi pazienti è stato diagnosticato un *deficit di GH*, per cui è stata intrapresa terapia sostitutiva con il raggiungimento di una statura finale compresa entro i limiti del target genetico. Negli altri due pazienti è stato invece diagnosticato un ritardo costituzionale semplice di pubertà e crescita che non ha necessitato di alcuna terapia.

**Grafico 4.** Percentuale di pazienti affetti da EAI-1 con malattie autoimmuni extraepatiche.



**Grafico 5.** Percentuale di pazienti affetti da EAI-1 con malattie autoimmuni extraepatiche.



## ***Complicanze***

In 1 sola paziente su 23 la malattia è evoluta determinando un'insufficienza epatocellulare. Si tratta di un caso di EAI-2 esordito con insufficienza epatica in una bambina di 13,2 anni con un quadro sottostante di epatopatia cronica e caratterizzato da un quadro istologico di cirrosi. La paziente che presenta una spiccata familiarità per malattie autoimmuni (sorella, fratello, madre), ha presentato oltre all'EAI altri disordini autoimmuni extraepatici associati (tiroidite autoimmune, sindrome da anticorpi anti fosfolipidi, entesite psoriasica, psoriasi guttata, vasculite). Durante i 12,6 anni di follow up la paziente ha presentato 6 recidive cliniche e bioumorali. All'età 23 anni ha inoltre presentato un episodio di ematemesi, successivo alla rottura di varici esofagee secondarie ad ipertensione portale. Data la grave compromissione della funzionalità epatica dopo 13,7 anni dalla diagnosi la paziente è stata sottoposta a trapianto di fegato.

## ***Effetti avversi della terapia***

Effetti avversi in pazienti in terapia convenzionale sono stati riscontrati, durante il follow-up, in 4 casi: in 3 pazienti era stata effettuata terapia con prednisone ed azatioprina, in 1 paziente terapia con solo prednisone. Tali effetti avversi, tutti comunque attribuibili alla terapia steroidea, comprendevano la comparsa di strie rubre sulla cute dell'addome e/o delle cosce (4), incremento ponderale marcato (2), osteoporosi con schiacciamento vertebrale (1) e cataratta (1).

Non è stato riscontrato invece alcun effetto avverso attribuibile all'utilizzo dell'azatioprina; in particolare nessun paziente ha sviluppato una linfopenia significativa. Una paziente, inoltre, ha condotto, in monoterapia con azatioprina, una gravidanza e un parto normodecorsa; la neonata non presentava patologie malformative.

Tra i pazienti in terapia con ciclosporina 8 hanno riportato degli effetti collaterali che sono stati ad ogni modo temporanei. In particolare è stata riscontrata un'ipertricosi (5), un'ipertrofia gengivale (5), un lieve incremento dei valori di creatininemia (2). Un solo paziente ha sviluppato delle ulcere gengivali dolorose che hanno motivato la sospensione del trattamento con ciclosporina con successivo ripristino dell'integrità della mucosa

geniena. In tutti gli altri pazienti gli effetti collaterali sono stati ben tollerati. In tutti i casi gli effetti collaterali della ciclosporina sono stati transitori e la risoluzione è avvenuta spontaneamente o successivamente alla riduzione della dose somministrata. La velocità di filtrazione glomerulare di tutti i pazienti in terapia con ciclosporina non ha mostrato differenze statisticamente significative tra l'inizio e la fine del follow-up.

### ***Ultimo follow-up***

Al termine del periodo di osservazione mediano di 12,7 anni (range 5,8-24,1 anni) tutti i pazienti sono viventi, 22 dei 23 pazienti con fegato nativo (96%) e l'età mediana è di 22,8 anni (24,9 per EAI-1 e 20,6 per EAI-2; range 7,9-34,7 anni).

Venti pazienti, in terapia immunosoppressiva da un tempo mediano di 11 anni (range 5,7-27 anni), sono attualmente in remissione clinica e bioumorale (9 con EAI-1 e 11 con EAI-2), in due soli casi di EAI-1 i titoli di IgG risultano persistentemente elevati, a fronte di un restante bilancio bioumorale epatico nella norma. Di questi pazienti, 5 sono, ad oggi, in terapia con prednisone e azatioprina, 9 in monoterapia con azatioprina, 2 con ciclosporina, 3 con ciclosporina ed azatioprina, 1 in triplice terapia con prednisone, azatioprina e ciclosporina. Sette dei pazienti in terapia con azatioprina e 2 dei pazienti in terapia con ciclosporina sono attualmente in fase di discontinuazione. Sono 5 i pazienti attualmente in monoterapia in remissione persistente di malattia da almeno 3 anni.

In due pazienti è stato possibile sospendere il trattamento immunosoppressivo. Il primo caso è quello di un paziente con EAI-1 che ha un follow-up di 23,1 anni. Quest'ultimo, sebbene abbia presentato 5 recidive bioumorali, ha interrotto il trattamento immunosoppressivo dopo 22,3 anni dall'inizio. Attualmente ha 29,8 anni, è in remissione clinica e bioumorale senza terapia da 10 mesi, pur continuando a presentare livelli di immunoglobuline superiori alle 2 DS. La seconda paziente fuori terapia, è invece affetta da EAI-2 ed ha un follow-up di 21,9 anni. A 12,9 anni dall'inizio di una terapia convenzionale ha tentativamente interrotto il trattamento immunosoppressivo, presentando tuttavia una ricaduta dopo 11 mesi. È stata quindi intrapresa terapia con ciclosporina e dopo 2,5 anni, è stato possibile sospendere definitivamente il trattamento

immunosoppressivo. La paziente ha attualmente 25,8 anni, ed è in remissione completa senza terapia da 6,1 anni.

Una paziente affetta da EAI-2, è stata sottoposta a trapianto di fegato all'età di 26,8 anni dopo 13,7 anni dall'inizio della terapia. Da segnalare che questa paziente presenta una importante comorbidità con severe patologie autoimmuni extraepatiche e che è l'unica paziente in cui, all'esordio della malattia, si evidenziava una cirrosi documentata istologicamente. La presenza di cirrosi all'esordio è quindi significativamente correlata al rischio di necessità di trapianto epatico ( $p < 0,01$ ).

**Tabella 6.** Outcome dei 23 pazienti affetti da EAI al termine del follow-up mediano di 12,7anni.

N° pazienti (%)	
<b>Pazienti in terapia immunosoppressiva (in remissione)</b>	<b>20 (87%)</b> <div>           {            9 AZA*            5 PDN + AZA            3 CSA + AZA            2 CSA♦            1 PDN + AZA + CSA           }         </div>
<b>Pazienti che hanno sospeso la terapia</b>	<b>2 (9%)</b>
<b>Pazienti sottoposti a trapianto di fegato</b>	<b>1 (4%)</b>
<b>Pazienti deceduti</b>	<b>0</b>

AZA: azatioprina; CSA: ciclosporina; PDN: prednisone

\* 4 in monoterapia da più di 3 anni.

♦ 1 in monoterapia da più di 3 anni

### **Predittori di outcome**

La valutazione dell'evoluzione a lungo termine dell'epatite autoimmune in età pediatrica è stata condotta tramite regressione lineare *per passi*, che ha analizzato il peso di 14 predittori. L'outcome positivo è stato definito da una remissione clinica e bioumorale persistente da almeno 3 anni in pazienti monoterapia.

Le variabili indagate sono: età all'esordio (maggiore vs minore di 4 anni), sesso, tipo di epatite, modalità di esordio clinico della malattia (acuto vs asintomatico), tipo di terapia (prednisone/azatioprina o prednisone vs ciclosporina), indici biochimici (ipertransaminasemia moderata vs severa;  $\gamma$ GT maggiori vs minori di N, IgG maggiori vs inferiori di 2DS, PT maggiore vs minore del 50%, albumina maggiore vs minore di 3,6 mg/dl), presenza di recidive in corso di trattamento, familiarità per malattie autoimmuni.

La regressione ha individuato quattro correlazioni statisticamente significative (*Tabella 5*): modalità di esordio della malattia ( $p < 0,01$ ), ALT ( $p < 0,01$ ), PT ( $p < 0,01$ ), tipo di EAI ( $p < 0,001$ ),  $\gamma$ GT ( $p < 0,05$ ). Per aumentare la potenza statistica del dato abbiamo eseguito una regressione logistica multivariata utilizzando come predittori di outcome positivo le variabili risultate statisticamente significative dalla precedente analisi; tuttavia la suddetta analisi non ha raggiunto la significatività statistica.

**Tabella 5.** Predittori di outcome: risultati della regressione lineare per passi.

<i>Predittori</i>	<i>p-value</i>
<i>Tipo di EAI, (EAI-1 vs EAI-2)</i>	<0,01
<i>Esordio, (acuto vs asintomatico)</i>	< 0,01
<i>ALT, ( 2-10 x N vs &gt;10 x N)</i>	< 0,01
<i><math>\gamma</math>GT, (&gt;N vs N)</i>	<0,05
<i>PT, (&gt;50% vs &lt;50%)</i>	<0,01

## ***2.4. Discussione***

Questo studio ha esaminato l'evoluzione a lungo termine dell'epatite autoimmune diagnosticata in età pediatrica in un gruppo di 23 pazienti analizzandone l'andamento per un periodo mediano di 12,7 anni, il più lungo follow-up riportato in letteratura.

Il 56% dei nostri pazienti è affetto da EAI-2, dato nettamente superiore a quanto riportato nelle altre casistiche europee ed extraeuropee<sup>2, 96, 98, 99</sup>.

I due tipi di epatite mostrano, all'esordio, caratteristiche cliniche e bioumorali differenti.

Nei bambini affetti da EAI-2 la malattia ha esordito, infatti, più precocemente, confermando quanto già precedentemente riportato in altri studi<sup>3, 45, 100</sup>.

Nella nostra casistica la modalità di esordio è stata, a differenza di quanto riscontrato in letteratura, più frequentemente acuta nei pazienti con EAI-1 rispetto ai pazienti con EAI-2 in cui la diagnosi è avvenuta, in più della metà dei casi, dopo il riscontro fortuito di un'ipertransaminasemia asintomatica. Tale dato è discordante a quanto riscontrato negli studi nord-europei, americani ed australiani presenti in letteratura<sup>2, 96, 98, 99</sup> ed è influenzato dalla maggiore presenza di pazienti con EAI-2 nella nostra casistica ed dalla peculiarità dei pazienti italiani che vengono spesso sottoposti, nei primi anni di vita, ad indagini ematiche routinarie comprendenti il dosaggio degli enzimi epatici.

In accordo con i dati della letteratura<sup>2</sup>, i pazienti affetti da EAI-1 mostrano un incremento delle IgG e delle  $\gamma$ GT all'esordio significativamente maggiore di quello riscontrato nei pazienti con EAI-2.

La familiarità per malattie autoimmuni nei parenti di primo grado è frequente. È stata, infatti, riscontrata nel 39% dei pazienti ed in particolare, anche se non in maniera statisticamente significativa nella nostra coorte, nelle EAI-2.

La prevalenza di malattie autoimmuni extraepatiche riscontrata nella nostra casistica è del 30%, simile a quella riportata negli altri studi<sup>3, 98</sup>. Nel 57% di questi pazienti è stata diagnosticata una tiroidite autoimmune e più frequentemente nei pazienti con EAI-2; la prevalenza di questa condizione è risultata maggiore rispetto a quanto riportato in altri lavori<sup>101</sup>, probabilmente perché nel nostro centro viene attuata una strategia di screening per la patologia tiroidea.

Dopo l'inizio del trattamento tutti i pazienti, sia in terapia convenzionale che con ciclosporina hanno raggiunto la remissione clinica e bioumorale dopo un periodo mediano di 8 settimane (range 4-35,9 settimane) senza differenze temporali statisticamente significative nell'EAI-1 e EAI-2.

Sette pazienti (30%) non hanno mai presentato recidive in corso di terapia immunosoppressiva. In questi casi l'epatite è stata diagnosticata all'età mediana di 2,7 anni, prima rispetto ai pazienti che hanno presentato recidive, anche se questa differenza di età alla diagnosi non ha raggiunto la significatività statistica.

Sedici pazienti (70%) hanno presentato una o più recidive durante il trattamento. Ognuno di questi pazienti ha presentato una mediana di 2 recidive. In accordo con quanto riportato da altri autori<sup>96</sup>, la prima recidiva è avvenuta dopo un periodo mediano di 6 anni dall'inizio del trattamento, mentre la seconda dopo 1 anno dalla prima. In tutti i casi una nuova remissione è stata ottenuta dopo un adeguamento della terapia.

L'analisi dei fattori predittivi di recidiva ha evidenziato il PT come parametro statisticamente significativo, seppure l'analisi di regressione multivariata sul dato non ha raggiunto la significatività statistica. Probabilmente ciò è dovuto alle piccole dimensioni del nostro campione; anche in un recente studio, infatti, un elevato INR, oltre alla presenza di autoanticorpi ANCA e di cirrosi all'esordio, è risultato associato ad un maggior rischio di fallimento terapeutico<sup>98</sup>. Nella nostra coorte, poi i pazienti affetti da patologie autoimmuni extraepatiche, presentavano un rischio maggiore statisticamente significativo di presentare una o più recidive rispetto ai pazienti senza patologie autoimmuni associate. Il rischio di recidiva non è dall'altra parte risultato in alcun modo correlato al tipo di epatite, alla modalità clinica di esordio, all'ipertransaminasemia, al tipo di terapia immunosoppressiva. Nel 31% dei casi le recidive sono state attribuibili ad una scarsa aderenza al trattamento immunosoppressivo.

In un sottogruppo di 4 pazienti la malattia è risultata di particolare difficile controllo, con recidive più frequenti rispetto alla mediana. In 3 di questi 4 pazienti, affetti da EAI-1, l'ipergammaglobulinemia è risultata caratteristicamente maggiore e persistente anche nei periodi di remissione rispetto ai pazienti con minor numero di recidive.

La probabilità di una recidiva di malattia a 5 anni dalla inizio della terapia è risultata del 45%, indicando la necessità di un trattamento immunosoppressivo prolungato.



In 7 pazienti (30%) è stato tentativamente sospeso il trattamento immunosoppressivo dopo un periodo mediano di 12,8 anni di terapia; in 5 pazienti (85%) la malattia ha recidivato dopo 6 mesi dalla sospensione.

Al termine del follow-up, tutti i pazienti sono viventi, l'età mediana è di 22,8 anni, 22 dei 23 pazienti con fegato nativo (96%). Questo dato è in accordo con quanto riportato in uno dei più recenti studi presenti in letteratura<sup>98</sup>.

La sospensione del trattamento immunosoppressivo è stata possibile in 2 pazienti (8%; 1 EAI-1, 1 EAI-2) rispettivamente fuori terapia da 10 e 74 mesi, dato analogo a quello riportato nello studio di *Radhakrishnan et al.* In altre casistiche la sospensione del trattamento è stata ottenuta in una percentuale maggiore di pazienti anche se è da segnalare che la durata del follow-up era nettamente inferiore.

Venti pazienti (87%; 9 EAI-1; 11 EAI-2) al termine del periodo di osservazione sono ancora in terapia immunosoppressiva con remissione clinica e bioumorale. Cinque di questi pazienti (22%; 2 EAI-1; 3 EAI-2) presentano un outcome positivo, definito come una remissione clinica e bioumorale persistente da almeno 3 anni in corso di monoterapia. .

In un solo caso di EAI-2 (4%), la malattia è progredita determinando un'insufficienza epatocellulare e manifestando le complicanze di un'ipertensione portale tale da rendere necessario un trapianto di fegato all'età di 26,8 anni, dopo 13,7 di terapia. Anche nel nostro studio, quindi, in accordo con lo studio *Saadah et al.* e *Deneau et al.* la presenza di cirrosi all'esordio della malattia rappresenta fattore prognostico per il trapianto di fegato<sup>96, 98</sup>.

Effetti avversi severi del trattamento immunosoppressivo sono stati riportati in 4 pazienti (17%), tutti attribuibili all'utilizzo di dosi elevate di steroide per periodi protratti e includono: obesità, cataratta responsabile di riduzione del visus, osteoporosi con crollo vertebrale e gravi conseguenze estetiche legati al prodursi di strie cutanee cicatriziali. Durante il periodo di follow-up non si sono registrati effetti avversi attribuibili ad azatioprina. Tale dato di prevalenza e di correlazione all'uso di steroide risulta in accordo con i dati presenti in letteratura<sup>102</sup>.

La ciclosporina ha presentato dall'altra parte, in accordo il riscontro della letteratura, un ottimo profilo di sicurezza nel trattamento dei pazienti con epatite autoimmune<sup>81, 103</sup> La somministrazione di ciclosporina ha determinato, infatti, solo modesti e soprattutto transitori effetti collaterali tra cui ipertricosi, ipertrofia gengivale e lieve incremento della creatininemia. In tutti questi casi gli effetti collaterali sono stati risolutivi con

normalizzazione del quadro clinico ed ematico avvenuto spontaneamente o successivamente alla riduzione della dose di ciclosporina somministrata. Non vi è evidenza di danno renale all'inizio ed alla fine del follow-up.

Attraverso la regressione lineare *per passi* abbiamo evidenziato 5 predittori significativi di outcome a lungo termine. Questi sono rappresentati dalla modalità di esordio clinico di epatite, dal tipo di epatite, dai livelli sierici di ALT,  $\gamma$ GT e dal PT. La regressione multivariata non ha raggiunto la significatività statistica per questi parametri, tuttavia in letteratura è già riportato il ruolo di predittivo del PT all'esordio<sup>2</sup>, ed è verosimile che l'analisi multivariata sia stata influenzata dalle piccole dimensioni del nostro campione in studio.

## ***2.5. Conclusioni***

La valutazione dell'evoluzione a lungo termine dell'epatite autoimmune di tipo 1 e 2 diagnosticata in età pediatrica ha evidenziato che un adeguato trattamento immunosoppressivo è associato con una sopravvivenza a lungo termine con il fegato nativo nella quasi totalità dei pazienti. È comunque presente, in ogni epoca della storia di un bambino con epatite autoimmune, il rischio di recidiva. L'inizio tempestivo del trattamento, l'identificazione precoce dei pazienti ad esordio più severo e scarsamente responsivi ed il controllo assiduo dell'aderenza alla terapia immunosoppressiva sono fattori essenziali per limitare l'incidenza delle recidive e quindi la progressione della malattia e delle sue complicanze tardive. Particolare attenzione deve essere inoltre posta ai pazienti che presentano un'associazione con malattie autoimmuni extraepatiche poiché hanno un rischio maggiore di recidiva nonostante il trattamento immunosoppressivo. La probabilità di recidiva nei primi 5 anni di terapia è risultata del 45%, indicando la necessità di una terapia prolungata.

Il trattamento può essere sospeso in una percentuale di pazienti, ma è comunque indispensabile un prolungato follow-up per rilevare le recidive tardive.

La necessità di trapianto epatico, significativamente correlata alla presenza di cirrosi all'esordio della malattia, è un'evenienza concreta seppure una terapia immunosoppressiva personalizzata ne riduce drasticamente l'occorrenza.

Il PT all'esordio della malattia rappresenta un fattore prognostico per l'outcome della malattia. Ulteriori studi sono necessari per confermare e ricercare fattori predittori di outcome, al fine di poter meglio indirizzare le scelte terapeutiche nel corso del tempo.

## *Bibliografia*

1. Maggiore G, Riva S, Sciveres M. Autoimmune diseases of the liver and biliary tract and overlap syndromes in childhood. *Minerva Gastroenterol Dietol.* 2009; **55**(1): 53-70.
2. Gregorio GV, Portmann B, Reid F, Donaldson PT, Doherty DG, McCartney M, et al. Autoimmune hepatitis in childhood: a 20-year experience. *Hepatology.* 1997; **25**(3): 541-7.
3. Maggiore G, Veber F, Bernard O, Hadchouel M, Homberg JC, Alvarez F, et al. Autoimmune hepatitis associated with anti-actin antibodies in children and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1993; **17**(4): 376-81.
4. Maggiore G, Bernard O, Homberg JC, Hadchouel M, Alvarez F, Hadchouel P, et al. Liver disease associated with anti-liver-kidney microsome antibody in children. *J Pediatr.* 1986; **108**(3): 399-404.
5. Boberg KM. Prevalence and epidemiology of autoimmune hepatitis. *Clin Liver Dis.* 2002; **6**(3): 635-47.
6. Toda G, Zeniya M, Watanabe F, Imawari M, Kiyosawa K, Nishioka M, et al. Present status of autoimmune hepatitis in Japan--correlating the characteristics with international criteria in an area with a high rate of HCV infection. Japanese National Study Group of Autoimmune Hepatitis. *J Hepatol.* 1997; **26**(6): 1207-12.
7. Deneau M, Jensen MK, Holmen J, Williams MS, Book LS, Guthery SL. Primary sclerosing cholangitis, autoimmune hepatitis, and overlap in Utah children: epidemiology and natural history. *Hepatology.* 2013; **58**(4): 1392-400.
8. Mieli-Vergani G, Heller S, Jara P, Vergani D, Chang MH, Fujisawa T, et al. Autoimmune hepatitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009; **49**(2): 158-64.
9. Czaja AJ, Donaldson PT. Genetic susceptibilities for immune expression and liver cell injury in autoimmune hepatitis. *Immunol Rev.* 2000; **174**: 250-9.
10. Longhi MS, Ma Y, Mieli-Vergani G, Vergani D. Aetiopathogenesis of autoimmune hepatitis. *J Autoimmun.* 2010; **34**(1): 7-14.
11. Donaldson PT. Genetics of autoimmune and viral liver diseases; understanding the issues. *J Hepatol.* 2004; **41**(2): 327-32.
12. Czaja AJ, Carpenter HA, Santrach PJ, Moore SB. Significance of HLA DR4 in type 1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology.* 1993; **105**(5): 1502-7.
13. Fortes Mdel P, Machado IV, Gil G, Fernandez-Mestre M, Dagher L, Leon RV, et al. Genetic contribution of major histocompatibility complex class II region to type

- 1 autoimmune hepatitis susceptibility in Venezuela. *Liver Int.* 2007; **27**(10): 1409-16.
14. Ma Y, Bogdanos DP, Hussain MJ, Underhill J, Bansal S, Longhi MS, et al. Polyclonal T-cell responses to cytochrome P450IID6 are associated with disease activity in autoimmune hepatitis type 2. *Gastroenterology.* 2006; **130**(3): 868-82.
  15. Scully LJ, Toze C, Sengar DP, Goldstein R. Early-onset autoimmune hepatitis is associated with a C4A gene deletion. *Gastroenterology.* 1993; **104**(5): 1478-84.
  16. Agarwal K, Czaja AJ, Jones DE, Donaldson PT. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphisms and susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology.* 2000; **31**(1): 49-53.
  17. Djilali-Saiah I, Ouellette P, Caillat-Zucman S, Debray D, Kohn JI, Alvarez F. CTLA-4/CD 28 region polymorphisms in children from families with autoimmune hepatitis. *Hum Immunol.* 2001; **62**(12): 1356-62.
  18. Longhi MS, Hussain MJ, Mitry RR, Arora SK, Mieli-Vergani G, Vergani D, et al. Functional study of CD4+CD25+ regulatory T cells in health and autoimmune hepatitis. *J Immunol.* 2006; **176**(7): 4484-91.
  19. La Cava A, Van Kaer L, Fu Dong S. CD4+CD25+ Tregs and NKT cells: regulators regulating regulators. *Trends in immunology.* 2006; **27**(7): 322-7.
  20. Cookson S, Constantini PK, Clare M, Underhill JA, Bernal W, Czaja AJ, et al. Frequency and nature of cytokine gene polymorphisms in type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology.* 1999; **30**(4): 851-6.
  21. Faubion WA, Gores GJ. Death receptors in liver biology and pathobiology. *Hepatology.* 1999; **29**(1): 1-4.
  22. Hiraide A, Imazeki F, Yokosuka O, Kanda T, Kojima H, Fukai K, et al. Fas polymorphisms influence susceptibility to autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol.* 2005; **100**(6): 1322-9.
  23. Ogawa S, Sakaguchi K, Takaki A, Shiraga K, Sawayama T, Mouri H, et al. Increase in CD95 (Fas/APO-1)-positive CD4+ and CD8+ T cells in peripheral blood derived from patients with autoimmune hepatitis or chronic hepatitis C with autoimmune phenomena. *J Gastroenterol Hepatol.* 2000; **15**(1): 69-75.
  24. Ahonen P, Myllarniemi S, Sipila I, Perheentupa J. Clinical variation of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) in a series of 68 patients. *N Engl J Med.* 1990; **322**(26): 1829-36.
  25. Lankisch TO, Strassburg CP, Debray D, Manns MP, Jacquemin E. Detection of autoimmune regulator gene mutations in children with type 2 autoimmune hepatitis and extrahepatic immune-mediated diseases. *J Pediatr.* 2005; **146**(6): 839-42.
  26. Vogel A, Strassburg CP, Manns MP. Genetic association of vitamin D receptor polymorphisms with primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis. *Hepatology.* 2002; **35**(1): 126-31.

27. Bjornsson E, Talwalkar J, Treeprasertsuk S, Kamath PS, Takahashi N, Sanderson S, et al. Drug-induced autoimmune hepatitis: clinical characteristics and prognosis. *Hepatology*. 2010; **51**(6): 2040-8.
28. Kerkar N, Choudhuri K, Ma Y, Mahmoud A, Bogdanos DP, Muratori L, et al. Cytochrome P4502D6(193-212): a new immunodominant epitope and target of virus/self cross-reactivity in liver kidney microsomal autoantibody type 1-positive liver disease. *J Immunol*. 2003; **170**(3): 1481-9.
29. Rigopoulou EI, Roggenbuck D, Smyk DS, Liaskos C, Mytilinaiou MG, Feist E, et al. Asialoglycoprotein receptor (ASGPR) as target autoantigen in liver autoimmunity: lost and found. *Autoimmun Rev*. 2012; **12**(2): 260-9.
30. Poralla T, Ramadori G, Dienes HP, Manns M, Gerken G, Dippold W, et al. Liver cell damage caused by monoclonal antibody against an organ-specific membrane antigen in vivo and in vitro. *J Hepatol*. 1987; **4**(3): 373-80.
31. Wen L, Peakman M, Lobo-Yeo A, McFarlane BM, Mowat AP, Mieli-Vergani G, et al. T-cell-directed hepatocyte damage in autoimmune chronic active hepatitis. *Lancet*. 1990; **336**(8730): 1527-30.
32. Loeper J, Descatoire V, Maurice M, Beaune P, Belghiti J, Houssin D, et al. Cytochromes P-450 in human hepatocyte plasma membrane: recognition by several autoantibodies. *Gastroenterology*. 1993; **104**(1): 203-16.
33. Hodgson HJ, Wands JR, Isselbacher KJ. Alteration in suppressor cell activity in chronic active hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978; **75**(3): 1549-53.
34. Longhi MS, Ma Y, Bogdanos DP, Cheeseman P, Mieli-Vergani G, Vergani D. Impairment of CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells in autoimmune liver disease. *J Hepatol*. 2004; **41**(1): 31-7.
35. Oo YH, Adams DH. Regulatory T cells and autoimmune hepatitis: defective cells or a hostile environment? *J Hepatol*. 2012; **57**(1): 6-8.
36. Wen L, Ma Y, Bogdanos DP, Wong FS, Demaine A, Mieli-Vergani G, et al. Pediatric autoimmune liver diseases: the molecular basis of humoral and cellular immunity. *Current molecular medicine*. 2001; **1**(3): 379-89.
37. Senaldi G, Lobo-Yeo A, Mowat AP, Mieli-Vergani G, Vergani D. Class I and class II major histocompatibility complex antigens on hepatocytes: importance of the method of detection and expression in histologically normal and diseased livers. *J Clin Pathol*. 1991; **44**(2): 107-14.
38. Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med*. 2009; **361**(9): 888-98.
39. McFarlane BM, McSorley CG, Vergani D, McFarlane IG, Williams R. Serum autoantibodies reacting with the hepatic asialoglycoprotein receptor protein (hepatic lectin) in acute and chronic liver disorders. *J Hepatol*. 1986; **3**(2): 196-205.
40. Vergani GM, Vergani D, Jenkins PJ, Portmann B, Mowat AP, Eddleston AL, et al. Lymphocyte cytotoxicity to autologous hepatocytes in HBsAg-negative chronic active hepatitis. *Clin Exp Immunol*. 1979; **38**(1): 16-21.

41. Vergani D, Mieli-Vergani G, Mondelli M, Portmann B, Eddleston AL. Immunoglobulin on the surface of isolated hepatocytes is associated with antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and liver damage. *Liver*. 1987; **7**(6): 307-15.
42. Longhi MS, Hussain MJ, Bogdanos DP, Quaglia A, Mieli-Vergani G, Ma Y, et al. Cytochrome P450IID6-specific CD8 T cell immune responses mirror disease activity in autoimmune hepatitis type 2. *Hepatology*. 2007; **46**(2): 472-84.
43. Longhi MS, Mitry RR, Samyn M, Scalori A, Hussain MJ, Quaglia A, et al. Vigorous activation of monocytes in juvenile autoimmune liver disease escapes the control of regulatory T-cells. *Hepatology*. 2009; **50**(1): 130-42.
44. Ferri S, Longhi MS, De Molo C, Lalanne C, Muratori P, Granito A, et al. A multifaceted imbalance of T cells with regulatory function characterizes type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology*. 2010; **52**(3): 999-1007.
45. Maggiore G, Porta G, Bernard O, Hadchouel M, Alvarez F, Homberg JC, et al. Autoimmune hepatitis with initial presentation as acute hepatic failure in young children. *J Pediatr*. 1990; **116**(2): 280-2.
46. Vajro P, Paoletta G, Maggiore G, Giordano G. Pediatric celiac disease, cryptogenic hypertransaminasemia, and autoimmune hepatitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013; **56**(6): 663-70.
47. Caprai S, Vajro P, Ventura A, Sciveres M, Maggiore G. Autoimmune liver disease associated with celiac disease in childhood: a multicenter study. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008; **6**(7): 803-6.
48. Nastasio S, Sciveres M, Riva S, Filippeschi IP, Vajro P, Maggiore G. Celiac disease-associated autoimmune hepatitis in childhood: long-term response to treatment. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013; **56**(6): 671-4.
49. Yeoman AD, Al-Chalabi T, Karani JB, Quaglia A, Devlin J, Mieli-Vergani G, et al. Evaluation of risk factors in the development of hepatocellular carcinoma in autoimmune hepatitis: Implications for follow-up and screening. *Hepatology*. 2008; **48**(3): 863-70.
50. Vitozzi S, Djilali-Saiah I, Lapierre P, Alvarez F. Anti-soluble liver antigen/liver-pancreas (SLA/LP) antibodies in pediatric patients with autoimmune hepatitis. *Autoimmunity*. 2002; **35**(8): 485-92.
51. Strassburg CP, Manns MP. Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis. *Semin Liver Dis*. 2002; **22**(4): 339-52.
52. Adams LA, Lindor KD, Angulo P. The prevalence of autoantibodies and autoimmune hepatitis in patients with nonalcoholic Fatty liver disease. *Am J Gastroenterol*. 2004; **99**(7): 1316-20.
53. Czaja AJ, Cassani F, Cataleta M, Valentini P, Bianchi FB. Frequency and significance of antibodies to actin in type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology*. 1996; **24**(5): 1068-73.
54. Manns MP, Vogel A. Autoimmune hepatitis, from mechanisms to therapy. *Hepatology*. 2006; **43**(2 Suppl 1): S132-44.

55. Aichele P, Bachmann MF, Hengartner H, Zinkernagel RM. Immunopathology or organ-specific autoimmunity as a consequence of virus infection. *Immunol Rev.* 1996; **152**: 21-45.
56. Strassburg CP, Obermayer-Straub P, Alex B, Durazzo M, Rizzetto M, Tukey RH, et al. Autoantibodies against glucuronosyltransferases differ between viral hepatitis and autoimmune hepatitis. *Gastroenterology.* 1996; **111**(6): 1576-86.
57. Simmonds MJ, Gough SC. Genetic insights into disease mechanisms of autoimmunity. *British medical bulletin.* 2004; **71**: 93-113.
58. Martini E, Abuaf N, Cavalli F, Durand V, Johanet C, Homberg JC. Antibody to liver cytosol (anti-LC1) in patients with autoimmune chronic active hepatitis type 2. *Hepatology.* 1988; **8**(6): 1662-6.
59. Han S, Tredger M, Gregorio GV, Mieli-Vergani G, Vergani D. Anti-liver cytosolic antigen type 1 (LC1) antibodies in childhood autoimmune liver disease. *Hepatology.* 1995; **21**(1): 58-62.
60. Wies I, Brunner S, Henninger J, Herkel J, Kanzler S, Meyer zum Buschenfelde KH, et al. Identification of target antigen for SLA/LP autoantibodies in autoimmune hepatitis. *Lancet.* 2000; **355**(9214): 1510-5.
61. Wachter B, Kyriatsoulis A, Lohse AW, Gerken G, Meyer zum Buschenfelde KH, Manns M. Characterization of liver cytokeratin as a major target antigen of anti-SLA antibodies. *J Hepatol.* 1990; **11**(2): 232-9.
62. Klein R, Berg PA. Glutathione S-transferase as a major autoantigen in anti-SLA-positive autoimmune hepatitis. *Gastroenterology.* 1999; **116**(4): 1015-6.
63. Vergani D, Alvarez F, Bianchi FB, Cancado EL, Mackay IR, Manns MP, et al. Liver autoimmune serology: a consensus statement from the committee for autoimmune serology of the International Autoimmune Hepatitis Group. *J Hepatol.* 2004; **41**(4): 677-83.
64. Bogdanos DP, Invernizzi P, Mackay IR, Vergani D. Autoimmune liver serology: current diagnostic and clinical challenges. *World J Gastroenterol.* 2008; **14**(21): 3374-87.
65. Poynard T, Ratzu V, Bedossa P. Appropriateness of liver biopsy. *Can J Gastroenterol.* 2000; **14**(6): 543-8.
66. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. The French METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology.* 1994; **20**(1 Pt 1): 15-20.
67. Caprai S, Vajro P, Ventura A, Sciveres M, Maggiore G. Autoimmune liver disease associated with celiac disease in childhood: a multicenter study. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2008; **6**(7): 803-6.
68. Senaldi G, Portmann B, Mowat AP, Mieli-Vergani G, Vergani D. Immunohistochemical features of the portal tract mononuclear cell infiltrate in chronic aggressive hepatitis. *Arch Dis Child.* 1992; **67**(12): 1447-53.



69. Brunt EM. Grading and staging the histopathological lesions of chronic hepatitis: the Knodell histology activity index and beyond. *Hepatology*. 2000; **31**(1): 241-6.
70. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol*. 1995; **22**(6): 696-9.
71. Rozario R, Ramakrishna B. Histopathological study of chronic hepatitis B and C: a comparison of two scoring systems. *J Hepatol*. 2003; **38**(2): 223-9.
72. Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol*. 1999; **31**(5): 929-38.
73. Hennes EM, Zeniya M, Czaja AJ, Pares A, Dalekos GN, Krawitt EL, et al. Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology*. 2008; **48**(1): 169-76.
74. Hiejima E, Komatsu H, Sogo T, Inui A, Fujisawa T. Utility of simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2011; **52**(4): 470-3.
75. Maggiore G, Bernard O, Hadchouel M, Hadchouel P, Odievre M, Alagille D. Treatment of autoimmune chronic active hepatitis in childhood. *J Pediatr*. 1984; **104**(6): 839-44.
76. Gregorio GV, McFarlane B, Bracken P, Vergani D, Mieli-Vergani G. Organ and non-organ specific autoantibody titres and IgG levels as markers of disease activity: a longitudinal study in childhood autoimmune liver disease. *Autoimmunity*. 2002; **35**(8): 515-9.
77. Cotler SJ, Jakate S, Jensen DM. Resolution of cirrhosis in autoimmune hepatitis with corticosteroid therapy. *J Clin Gastroenterol*. 2001; **32**(5): 428-30.
78. Maggiore G, Bernard O, Hadchouel M, Hadchouel P, Odievre M, Alagille D. Treatment of autoimmune chronic active hepatitis in childhood. *J Pediatr*. 1984; **104**(6): 839-44.
79. Cuarterolo ML, Ciocca ME, Lopez SI, de Davila MT, Alvarez F. Immunosuppressive therapy allows recovery from liver failure in children with autoimmune hepatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2011; **9**(2): 145-9.
80. Aggarwal N, Chopra S, Suri V, Sikka P, Dhiman RK, Chawla Y. Pregnancy outcome in women with autoimmune hepatitis. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2011; **284**(1): 19-23.
81. Alvarez F, Ciocca M, Canero-Velasco C, Ramonet M, de Davila MT, Cuarterolo M, et al. Short-term cyclosporine induces a remission of autoimmune hepatitis in children. *J Hepatol*. 1999; **30**(2): 222-7.
82. Martin SR, Alvarez F, Anand R, Song C, Yin W. Outcomes in children who underwent transplantation for autoimmune hepatitis. *Liver Transpl*. 2011; **17**(4): 393-401.

83. Chai PF, Lee WS, Brown RM, McPartland JL, Foster K, McKiernan PJ, et al. Childhood autoimmune liver disease: indications and outcome of liver transplantation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010; **50**(3): 295-302.
84. Longhi MS, Meda F, Wang P, Samyn M, Mieli-Vergani G, Vergani D, et al. Expansion and de novo generation of potentially therapeutic regulatory T cells in patients with autoimmune hepatitis. *Hepatology.* 2008; **47**(2): 581-91.
85. Murray-Lyon IM, Stern RB, Williams R. Controlled trial of prednisone and azathioprine in active chronic hepatitis. *Lancet.* 1973; **1**(7806): 735-7.
86. Stellon AJ, Hegarty JE, Portmann B, Williams R. Randomised controlled trial of azathioprine withdrawal in autoimmune chronic active hepatitis. *Lancet.* 1985; **1**(8430): 668-70.
87. Cook GC, Mulligan R, Sherlock S. Controlled prospective trial of corticosteroid therapy in active chronic hepatitis. *Q J Med.* 1971; **40**(158): 159-85.
88. Johnson PJ, McFarlane IG, Williams R. Azathioprine for long-term maintenance of remission in autoimmune hepatitis. *N Engl J Med.* 1995; **333**(15): 958-63.
89. Maggiore G, Bernard O, Hadchouel M, Alagille D. Life-saving immunosuppressive treatment in severe autoimmune chronic active hepatitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1985; **4**(4): 655-8.
90. Soloway RD, Summerskill WH, Baggenstoss AH, Geall MG, Gitnick GL, Elveback IR, et al. Clinical, biochemical, and histological remission of severe chronic active liver disease: a controlled study of treatments and early prognosis. *Gastroenterology.* 1972; **63**(5): 820-33.
91. Mistilis SP, Skyring AP, Blackburn CR. Natural history of active chronic hepatitis. I. Clinical features, course, diagnostic criteria, morbidity, mortality and survival. *Australas Ann Med.* 1968; **17**(3): 214-23.
92. Krawitt EL. Autoimmune hepatitis. *N Engl J Med.* 2006; **354**(1): 54-66.
93. Feld JJ, Dinh H, Arenovich T, Marcus VA, Wanless IR, Heathcote EJ. Autoimmune hepatitis: effect of symptoms and cirrhosis on natural history and outcome. *Hepatology.* 2005; **42**(1): 53-62.
94. Roberts SK, Therneau TM, Czaja AJ. Prognosis of histological cirrhosis in type 1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology.* 1996; **110**(3): 848-57.
95. Yoshizawa K, Matsumoto A, Ichijo T, Umemura T, Joshita S, Komatsu M, et al. Long-term outcome of Japanese patients with type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology.* 2012; **56**(2): 668-76.
96. Saadah OI, Smith AL, Hardikar W. Long-term outcome of autoimmune hepatitis in children. *J Gastroenterol Hepatol.* 2001; **16**(11): 1297-302.
97. Radhakrishnan KR, Alkhouri N, Worley S, Arrigain S, Hupertz V, Kay M, et al. Autoimmune hepatitis in children--impact of cirrhosis at presentation on natural history and long-term outcome. *Dig Liver Dis.* 2010; **42**(10): 724-8.

98. Deneau M, Book LS, Guthery SL, Jensen MK. Outcome after Discontinuation of Immunosuppression in Children with Autoimmune Hepatitis: A Population-Based Study. *J Pediatr*. 2014.
99. Radhakrishnan KR, Alkhouri N, Worley S, Arrigain S, Hupertz V, Kay M, et al. Autoimmune hepatitis in children--impact of cirrhosis at presentation on natural history and long-term outcome. *Dig Liver Dis*. 2010; **42**(10): 724-8.
100. Homberg JC, Abuaf N, Bernard O, Islam S, Alvarez F, Khalil SH, et al. Chronic active hepatitis associated with antiliver/kidney microsome antibody type 1: a second type of "autoimmune" hepatitis. *Hepatology*. 1987; **7**(6): 1333-9.
101. Efe C, Wahlin S, Ozaslan E, Berlot AH, Purnak T, Muratori L, et al. Autoimmune hepatitis/primary biliary cirrhosis overlap syndrome and associated extrahepatic autoimmune diseases. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2012; **24**(5): 531-4.
102. Liberal R, Grant CR, Mieli-Vergani G, Vergani D. Autoimmune hepatitis: a comprehensive review. *J Autoimmun*. 2013; **41**: 126-39.
103. Sciveres M, Caprai S, Palla G, Ughi C, Maggiore G. Effectiveness and safety of ciclosporin as therapy for autoimmune diseases of the liver in children and adolescents. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004; **19**(2): 209-17.